— UNIVERSITÉ DE BORDEAUX —

Année scolaire 1968 — N° 2

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

## DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR

**Philippe MIGNON**

PHARMACIEN

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CONTRÔLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MÉDICAMENTS

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE PHARMACODYNAMIE ET D'ESSAIS BIOLOGIQUES

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES SPÉCIALES D'HÉMATOLOGIE

INTERNE DES HÔPITAUX DE BORDEAUX

né à Taourirt (Maroc), le 10 février 1941

**1re Thèse :** PHARMACODYNAMIE ET STRUCTURE
ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ VITAMINIQUE K ET ANTI-VITAMINIQUE K EN SÉRIE α-NAPHTOQUINONIQUE.

**2me Thèse :** *Question proposée par la Faculté :* MODE D'ACTION DES SUBSTANCES ANTICANCÉREUSES.

*Soutenues le 4 mars 1968, devant la Commission d'Examen :*

Examinateurs de la thèse

MM. TAYEAU, Professeur ..... *Président.*
COLLETER, Professeur .....
CANELLAS, Professeur ..... *Juges.*
GAY, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux .....

— 1968 —

— UNIVERSITÉ DE BORDEAUX —

Année scolaire 1968 — N° 2

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

## DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

PAR


**Philippe MIGNON**

PHARMACIEN

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CONTRÔLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MÉDICAMENTS

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE PHARMACODYNAMIE ET D'ESSAIS BIOLOGIQUES

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES SPÉCIALES D'HÉMATOLOGIE

INTERNE DES HÔPITAUX DE BORDEAUX

né à Taourirt (Maroc), le 10 février 1941


**1re Thèse :** PHARMACODYNAMIE ET STRUCTURE
ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ VITAMINIQUE K ET ANTI-VITAMINIQUE K EN SÉRIE α-NAPHTOQUINONIQUE.

**2me Thèse :** *Question proposée par la Faculté :* MODE D'ACTION DES SUBSTANCES ANTICANCÉREUSES.

*Soutenues le 4 mars 1968, devant la Commission d'Examen :*

**Examinateurs de la thèse**

| | |
|---|---|
| MM. TAYEAU, Professeur ..... | *Président.* |
| COLLETER, Professeur ..... | *Juges.* |
| CANELLAS, Professeur ..... | |
| GAY, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux ..... | |

— 1968 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

**DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS.**
**DOYEN : M. F. TAYEAU. — ASSESSEURS : MM. P. LAUMONIER, N...**

## PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, R. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIÈRE, R. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X. J. DUBECQ, L. MASSÉ, A. LACHAPÈLE, R. DE GRAILLY, G. VITTE.

## PROFESSEURS TITULAIRES

| MM. | |
|---|---|
| N..... | Pharmacie chimique et pharmacodynamie. |
| P. DELMAS-MARSALET.... | Clinique des maladies nerveuses et mentales. |
| P. DERVILLÉE..... | Médecine légale et Médecine du travail. |
| R. MANDOUL..... | Zoologie et parasitologie. |
| R. CASTAGNOU..... | Toxicologie et hygiène appliquée. |
| J. REBOUL..... | Carcinologie. |
| P. MESNARD..... | Chimie organique et Chimie analytique. |
| R. GRANDPIERRE..... | Physiologie. |
| P. BROUSTET..... | Clinique médicale cardiologique. |
| J. MAGENDIE..... | Clinique chirurgicale. |
| F. TAYEAU..... | Biochimie médicale A. |
| G. MAYER..... | Histologie et embryologie. |
| P. BLANQUET..... | Physique nucléaire appliquée et radiobiologie. |
| N..... | Pathologie générale et expérimentale. |
| R. SARIC..... | Clinique médicale. |
| L. POUYANNE..... | Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique. |
| J.-J. DUBARRY..... | Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif. |
| F.-J. TRAISSAC..... | Clinique thérapeutique. |
| R. MAHON..... | Clinique d'accouchements. |
| R. PAUTRIZEL..... | Immunologie et biologie parasitaire. |
| M^lle G. ROUGIER..... | Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports. |
| G. MOUSTARDIER..... | Bactériologie. |
| E. BESSIÈRE..... | Clinique ophtalmologique. |
| H. LEGER..... | Anatomie pathologique. |
| J. MASQUELIER..... | Matière médicale. |
| G. MORETTI..... | Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale. |
| J. DESPONS..... | Clinique d'oto-rhino-laryngologie. |
| P. LAUMONIER..... | Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire. |
| J. LENG-LÉVY..... | Clinique médicale et des maladies infectieuses. |
| R. LETAC..... | Pathologie et recherche chirurgicales. |
| R. QUILICHINI..... | Pharmacie galénique. |
| E. NEUZIL..... | Biochimie médicale B. |
| R. STOLL..... | Biologie. |
| J. LANGE..... | Clinique urologique. |
| P. FRÉOUR..... | Hygiène et Clinique de pneumophtisiologie. |
| F. RIGAUD..... | Anatomie. |
| J. FAURE..... | Physio-pathologie et neuro-physiologie. |
| G. DUBOURG..... | Clinique chirurgicale des maladies cardiaques. |
| J. VILLAR..... | Clinique gynécologique. |
| P. LE COULANT..... | Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. |
| M. BERGOUIGNAN..... | Pathologie nerveuse et mentale. |
| J. DUHAMEL..... | Physique médicale et pharmaceutique. |
| N..... | Sémiologie médicale. |
| H. CHOUSSAT..... | Pathologie médicale. |
| L. CHASTRUSSE..... | Clinique obstétricale. |
| P. VERGER..... | Clinique médicale des maladies des enfants. |
| F. LAPORTE..... | Chirurgie générale. |
| R. TINGAUD..... | Clinique chirurgicale. |
| N..... | Sémiologie chirurgicale. |
| H. LAUBIE..... | Botanique et cryptogamie. |
| Cl. RICHIR..... | Anatomie pathologique. |
| R. GOLSE..... | Chimie générale et Chimie minérale. |
| J. BAILENGER..... | Zoologie et biologie animale. |
| J.-Cl. COLLETER..... | Chimie analytique. |
| H. BRICAUD..... | Médecine générale. |
| P. BENOIT..... | Clinique odonto-stomatologique. |
| Cl. MARTIN-DUPONT..... | Clinique néphrologique |
| J. CANELLAS..... | Pharmacodynamie et hydrologie. |
| G. DELORME..... | Electroradiologie. |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

| MM. | |
|---|---|
| R. CANIVENC | Histologie. |
| J. RIVIÈRE | Médecine générale. |
| J. DAVID-CHAUSSÉ | Médecine générale. |
| J. MARQUEVIELLE | Biochimie médicale. |
| H. DULONG DE ROSNAY | Bactériologie. |
| M. BLANC | Neuro-psychiatrie. |
| Cl. MASSÉ | Chirurgie générale. |
| R. MARAUD | Histologie et embryologie. |
| P. DU PASQUIER | Bactériologie. |
| J. STAEFFEN | Médecine générale. |
| J.-P. DUBECQ | Obstétrique. |
| R. CROCKETT | Chimie organique et chimie analytique. |
| G. NEVERRE | Physiologie. |
| A. SERISÉ | Hygiène. |

## MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS :

| MM. | |
|---|---|
| J. MEUNIER | Histologie. |
| P. FERRET-BOUIN | Physique médicale. |
| R. JENSEN | Chimie biologique. |
| J. VIDEAU | Anatomie. |
| J. BROUSSIN | Electroradiologie. |
| A. CASTAING | Médecine générale et thérapeutique. |
| R. TESSIER | Pneumo-phtisiologie. |
| Mme J. SÉCHET | Biochimie médicale. |
| C. LAGARDE | Carcinologie. |
| C. BÉRAUD | Thérapeutique. |
| H. LAZARINI | Médecine légale et Médecine du travail. |
| J. SOUMIREU-MOURAT | Obstétrique. |
| G. CABANIEU | Médecine générale. |
| R. LE LOURD | Pneumo-phtisiologie. |
| L. COURAUD | Chirurgie générale. |
| J. BENTÉGEAT | Hématologie. |
| Cl. VRIGNAUD | Physique pharmaceutique. |
| M. BERGER | Oto-rhino-laryngologie. |
| P. SOURREIL | Dermato-vénéréologie. |
| L. ARNÉ | Médecine générale et thérapeutique. |
| Cl. MARTIN | Pédiatrie. |
| R. BAUTE | Cryptogamie. |
| V. DARGELOS | Microbiologie. |
| Mlle S. LARCEBAU | Toxicologie. |
| C. WONÉ | Médecine générale et thérapeutique. |
| J. JULIEN | Médecine générale et thérapeutique. |
| J.-J. BATTIN | Pédiatrie. |
| M. DALLOCCHIO | Cardiologie et maladies vasculaires. |
| J. AUBERTIN | Maladies infectieuses. |
| P. VÉRIN | Ophtalmologie. |
| M. GOT | Neuro-chirurgie. |
| J. TAVERNIER | Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique. |
| J. VINCENT | Physiologie et explorations fonctionnelles. |
| L. CHEVAIS | Anesthésiologie. |
| G. GILLARDEAU | Anesthésiologie. |
| J. HONTON | Orthopédie et traumatologie. |
| M. BOMBART | Orthopédie et traumatologie. |
| A. HUGUES | Cancérologie. |
| M. SABATHIÉ | Anesthésiologie. |

## AGRÉGÉS EN EXERCICE :

| MM. | |
|---|---|
| J. DEPAULIS | Chirurgie générale. |
| P. DARMAILLACQ | Chirurgie générale. |
| L. CORCELLE | Ophtalmologie. |
| M. PORTMANN | Oto-rhino-laryngologie. |
| P. BLANCHOT | Médecine générale. |
| L. DOUTRE | Chirurgie générale. |
| F. BALLANGER | Urologie. |
| P. BIRBIS | Chirurgie générale. |
| J.-P. CALAMEL | Chirurgie générale. |
| L. TEXIER | Dermato-syphiligraphie. |
| H. POUYANNE | Neuro-chirurgie. |

.../...

MM. **AGRÉGÉS EN EXERCICE (suite)**

P. LOISEAU..... Neurologie et psychiatrie.
R. GENESTE..... Orthopédie.
F. FONTAN..... Chirurgie générale.
J. LASSERRE..... Orthopédie.

**AGRÉGÉS LIBRES**

MM.
G. FAUGÈRE..... Obstétrique.
M. L'ÉPÉE..... Médecine légale.
H. CABANIÉ..... Anatomie.

**CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES :**

MM.
P. BONJEAN..... Anatomie.
M. LAHOURCADE..... Parasitologie.
M. SENTENAC..... Anatomie.
G. DELMON..... Anatomie pathologique.
J. TRIBOULEY..... Immunologie, sérologie.
F.-X. MICHELET..... Stomatologie.

*L'Attaché d'administration universitaire, chef des Services administratifs :*

Mme M. C. CHAPENOIRE.

---

**Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.**

A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma femme

A tous ceux qui me sont chers

A NOS MAITRES DE L'INTERNAT

*Hommage respectueux*

A NOS CAMARADES DE L'INTERNAT

*Avec toute ma sympathie*

AUX MEMBRES DU COMITE DE LECTURE

Monsieur V. DARGELOS

*Maître de Conférences agrégé de Microbiologie*
*Docteur en Pharmacie ( Etat )*
*Licencié ès Sciences*
*Officier des Palmes Académiques*

Monsieur le Docteur J. BENTEGEAT

*Maître de Conférences agrégé d'Immunologie,*
*Sérologie et Hématologie*
*Biologiste des Hôpitaux*
*Chef de Service*
*Croix de guerre 1939-1945*
*Chevalier des Palmes Académiques*

En acceptant de faire partie de notre comité de lecture,vous nous avez permis de bénéficier de vos grandes compétences.

Veuillez trouver ici,avec nos remerciements,l'expression de notre réelle gratitude.

# A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J. CANELLAS

*Professeur de Pharmacodynamie et Hydrologie*
*Officier des Palmes Académiques*

L'atmosphère de cordiale sympathie et l'aide efficace que nous avons trouvées dans votre laboratoire nous ont été précieuses. Nous vous adressons nos sincères remerciements pour les encouragements que vous nous avez prodigués et pour l'intérêt que vous avez bien voulu manifester pour notre travail.

Monsieur le Professeur J.C. COLLETER

*Professeur de Chimie Analytique*
*Chevalier des Palmes Académiques*

Depuis quatre ans, vous avez toujours fait preuve à mon égard d'une confiance absolue. Avec une affectueuse bienveillance, vous ne m'avez ménagé ni votre temps ni vos conseils. Aussi, est-ce avec une joie réelle mais une émotion profonde que je me permets de vous exprimer mon entier dévouement et l'assurance de mon indéfectible attachement.

Monsieur le Professeur R. GAY

*Assesseur à la Faculté des Sciences de Bordeaux*
*Professeur de Minéralogie et de Cristallographie*
*Officier des Palmes Académiques*

Votre présence parmi nos juges nous honore. En acceptant de lire ce travail avant son impression, vous nous avez permis d'y apporter certaines corrections nécessaires. Nous vous remercions des conseils et des précisions que vous nous avez fournis.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur F. TAYEAU

*Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie.*
*Membre correspondant de l'Académie de Médecine.*
*Professeur de Biochimie Médicale.*
*Médecin Biologiste des Hôpitaux.*
*Docteur ès Sciences.*
*Chevalier de la Légion d'Honneur.*
*Commandeur des Palmes Académiques.*
*Officier de l'Ordre National du Mérite.*
*Chevalier de la Santé Publique.*
*Chevalier du Mérite Agricole.*
*Médaille de Vermeil du Service de la Santé de la Marine.*
*Officier du Mérite Scientifique.*
*Grand Croix de l'Ordre du Saint-Sépulcre.*
*Commandeur de l'Ordre National Sénégalais.*
*Titulaire de l'Ordre Sapasse (1ere classe) Iran.*
*Titulaire(2ème degré) de la décoration Danesche (Iran ).*

Malgré vos lourdes occupations, vous nous faites le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Nous tenons à vous exprimer ici notre vive gratitude et notre profond respect.

Avant d'exposer notre travail, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à MM. GAULTIER et HAUW dont les travaux nous ont fourni le sujet même de cette thèse. Leur esprit d'équipe et leur cordialité nous ont profondément touché.

Madame HOUSTY ne s'est pas seulement contentée de nous ouvrir les portes de son laboratoire; avec son égale gentillesse, elle nous a apporté son aide précieuse dans notre travail de synthèse. Qu'elle veuille bien trouver ici le gage notre respectueuse gratitude.

Pour leur dévouement et leur efficacité, que soient remerciées les personnes qui ont apporté leur collaboration à la réalisation pratique de cet ouvrage et tout particulièrement :

- M. et Mme DUBIEF
- M. HAGET

Nous n'oublierons jamais ce que vous avez fait pour nous.

Nos remerciements vont aussi à Mme PERALES pour le soin qu'elle a apporté dans l'entretien de nos animaux.

x x

x

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION ..... 1

PREMIERE PARTIE - ETUDE THEORIQUE ..... 4

CHAPITRE I - VITAMINES K - ANTI-VITAMINES K

1-1 Vitamines K

1-1-1 Substances naturelles ..... 5
1-1-2 Substances de synthèse ..... 7

1-2 Anti-vitamines K

1-2-1 Substances naturelles ..... 10
1-2-2 Substances de synthèse ..... 11

1-3 Structure et activité

1-3-1 Travaux de MENTZER ..... 17
1-3-2 Travaux de GAULTIER et HAUW ..... 20

CHAPITRE II - VITAMINES K ET COAGULATION

2-1 Introduction ..... 24

2-2 Physiologie de la coagulation ..... 25

2-2-1 Temps pariétal ..... 26
2-2-2 Coagulation proprement dite ..... 27

2-3 Importance des vitamines K ..... 36

2-4 Mécanisme d'action biologique des vita - mines K ..... 37

2-4-1 Première théorie ..... 37
2-4-2 Deuxième théorie ..... 38

Pages

DEUXIEME PARTIE - SYNTHESES DES SUBSTANCES ETUDIEES

CHAPITRE I - SYNTHESES DE LA BROMO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4 ET DE LA CHLORO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4 .... 41

1-1 Bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 41

1-1-1 Préparation de la dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 ..... 41

1-1-2 Préparation de la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 44

1-2 Chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 46

CHAPITRE II - SYNTHESES DE LA BROMO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4 ET DE LA CHLORO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4 .... 48

1-1 Bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ..... 48

1-2 Chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ..... 49

CHAPITRE III - SYNTHESES DE LA METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4 ..... 50

1-1 Préparation de la méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4 ..... 50

1-2 Préparation de la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 52

TROISIEME PARTIE - ETUDE TOXICOLOGIQUE

CHAPITRE I - PRINCIPE

1-1 Détermination de la DL50 ..... 56

1-2 Détermination de l'écart type ..... 57

CHAPITRE II - RESULTATS EXPERIMENTAUX ..... 58

COMMENTAIRE ..... 64

Pages

QUATRIEME PARTIE - ETUDE PHARMACODYNAMIQUE

CHAPITRE I - CHOIX DES TESTS ..... 66

CHAPITRE II - DESCRIPTION DES TESTS CHOISIS

2-1 Temps de QUICK ..... 68

2-2 Thromboélastographie ..... 77

CHAPITRE III - NOS CONDITIONS DE TRAVAIL

3-1 La prise de sang ..... 84

3-2 Le matériel ..... 85

3-3 L'anticoagulant ..... 85

3-4 Délai entre le prélèvement et l'examen ..... 86

3-5 Séparation des éléments figurés ..... 87

CHAPITRE IV - ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-VITAMINIQUE K

4-1 Introduction ..... 88

4-2 Protocole opératoire ..... 88

4-2-1 Mode d'administration des substances 88
4-2-2 Prélèvement des échantillons de sang 88
4-2-3 Tests pratiqués ..... 88

4-3 Résultats ..... 89

4-3-1 Dérivés aminés ..... 89
4-3-1-1 Chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 92
4-3-1-2 Bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 93
4-3-2 Dérivés hydroxylés ..... 94
4-3-2-1 Chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ..... 94
4-3-2-2 Bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ..... 95
COMMENTAIRES ..... 96
4-3-3 Pindione ..... 98
COMMENTAIRES ..... 98

Pages

CHAPITRE V - ETUDE DE L'ACTIVITE VITAMINIQUE K par une méthode personnelle

5-1 Introduction ..... 99

5-2 Protocole opératoire ..... 100

5-2-1 Obtention de la carence en vitamine K 101

5-2-2 Détermination de l'activité vitaminique K ..... 103

5-3 Résultats ..... 104

5-3-1 Mise en évidence de la carence ..... 104

COMMENTAIRES ..... 106

5-3-2 Mise en évidence de l'activité antivitaminique K ..... 108

5-3-2-1 Méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ..... 110

COMMENTAIRES ..... 116

5-3-2-2 Méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ..... 118

COMMENTAIRES ..... 124

5-3-2-3 Vitamine $K_1$ ..... 128

COMMENTAIRES ..... 130

5-4 Etude bactériologique ..... 130

CHAPITRE VI - DISCUSSION DES RESULTATS

6-1 Remarques sur la " prévision de l'activité biologique " ..... 131

6-2 Prévision de l'activité dans la série des dérivés α-naphtoquinonique ..... 132

CONCLUSION GENERALE ..... 136

BIBLIOGRAPHIE ..... 138

# INTRODUCTION

Dans le cadre des recherches entreprises initialement par Pierre ROMAIN, sur le problème des relations entre l'activité biologique et la structure cristalline des molécules, le Professeur J.C.COLLETER nous a proposé d'étudier l'action de certains dérivés naphtoquinoniques sur la coagulation sanguine.

Pour Pierre ROMAIN , la meilleure voie permettant de comprendre le fait que des molécules apparemment différentes ont des activités analogues , consiste à étudier leur structure cristalline (71) . En effet , les molécules telles qu'elles existent dans l'espace cristallin - à trois dimensions - peuvent présenter des analogies qui sont impossibles à voir avec certitude sur les modèles habituels des chimistes .

Des relations du même ordre peuvent exister entre molécules ayant des activités antagonistes. Les découvertes de WOODS (83) et FILDES (28) ont mis en relief l'existence d'une zone moléculaire commune entre l'acide para-amino-benzoïque et son antagoniste , la sulfamide . De nombreux biochimistes saisirent toute l'importance de cette ressemblance partielle entre molécules que MACHEBOEUF qualifia plus tard d'icélomorphes (50). Dans ce cas égale-

ment, les cristallographes, en fournissant aux biologistes une image - à un très fort grossissement - de la molécule réelle, peuvent semble-t-il contribuer à expliquer les phénomènes (16).

De nombreuses études cristallographiques orientées vers la recherche d'analogies ont été entreprises par plusieurs équipes du laboratoire du Professeur GAY les unes sur des séries de molécules douées d'activité du même type ( ammoniums quaternaires, barbituriques, phénothiazines ) les autres sur des familles de molécules biologiquement antagonistes ( acide para-amino benzoïque sulfamides, vitamines K anti-vitamines K ).

GAULTIER et HAUW ont déterminé non seulement les structures des substances connues comme vitamines K ou comme anti-vitamines K, mais aussi celles des dérivés α-naphtoquinoniques voisins qui n'avaient fait l'objet d'aucun examen de leur action sur la coagulation sanguine. Ceci présentait un intérêt tout particulier car la comparaison des structures de ces derniers dérivés avec celles des molécules dont l'activité était connue conduisit GAULTIER (30) et HAUW (34) à émettre les hypothèses suivantes :

" La méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 doit avoir les propriétés d'une vitamine K, tandis que la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 , la chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 et la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 doivent avoir des propriétés anti-vitaminiques K ".

Affirmer que le dérivé méthylé en 2 doit présenter une activité vitaminique et les trois dérivés halogénés en 2 une activité anti-vitaminique s'accorde avec les travaux de MENTZER (54). Il faut remarquer cette convergence des analyses cristallographiques et des conclusions des chimistes ( v. p. 17 à 23 ) qui nous a conduits à entreprendre l'étude biologique de ces quatre produits, comparée avec celle de substances de références.

Notre but est donc avant tout de vérifier ces hypothèses.
Ce travail représente de plus, l'un des premiers essais de vérification expérimentale des idées de Pierre ROMAIN sur l'apport de la cristallographie au domaine de la recherche biologique et pharmacodynamique.

Au cours de l'histoire des vitamines K et de leurs antagonistes, les auteurs furent déjà amenés à se pencher sur les relations entre leur structure chimique et leur activité biologique. Nous rappellerons donc les connaissances actuelles dans ce domaine.

L'origine anglo-saxonne du nom vitamine K ( Koagulation vitamin ) montre bien la nécessité d'une étude de la coagulation sanguine afin de mieux définir le rôle de ces substances et aussi celui des anti-vitamines K.

Après cette étude théorique, l'exposé de notre expérimentation comportera trois parties :

- La synthèse chimique des dérivés étudiés
- Leurs essais toxicologiques
- Leur étude pharmacodynamique qui nous permettra de rechercher dans quelle mesure les résultats expérimentaux sont en accord avec les hypothèses de GAULTIER et HAUW .

# PREMIERE PARTIE

# ETUDE THEORIQUE

# CHAPITRE I

# VITAMINES K - ANTI-VITAMINES K

## *1-1 VITAMINES K*

### *1-1-1 SUBSTANCES NATURELLES*

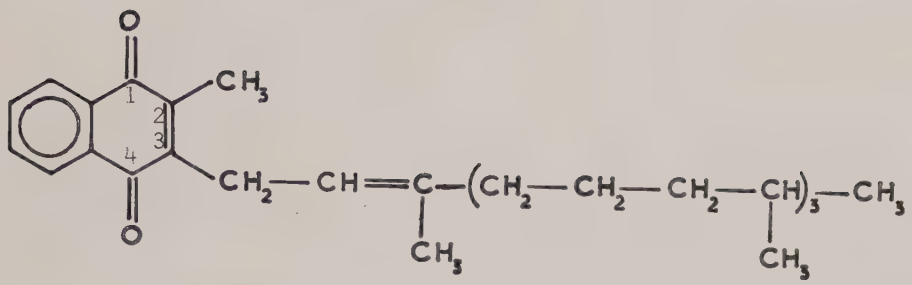
#### *1-1-1-1 Vitamine $K_1$*

En 1935, DAM de Copenhague (17) (18), recherchant l'origine de la maladie hémorragique du Poussin soumis à un régime carencé, arriva à la conclusion que cette affection était curable par la fraction non stérolique de l'extrait lipidique de feuilles fraîches.

Cette substance liposoluble anti-hémorragique fut appelée vitamine $K_1$.
Son rôle important, découvert plus tard, dans la photosynthèse explique sa présence dans les chloroplastes des végétaux et justifie le nom de phylloquinone (φυλλον feuille ) que lui a attribué la Commission de Nomenclature.

En 1939, KARRER (40) à Zurich et DOISY (51) (8) aux Etats Unis l'isolèrent presque simultanément de la luzerne.

DOISY (48) élucida sa constitution en 1940 par ozonisation et oxydation; elle répond à la formule brute $C_{31}\ H_{46}\ O_2$: c'est la méthyl-2 phytyl-3 naphtoquinone-1,4.



Après son isolement et la détermination de sa formule, cette substance fut reproduite au laboratoire : les trois écoles de DOISY (7), de FIESER (25) et d'ALMQUIST (2) publièrent indépendamment leurs synthèses dans le même fascicule du " Journal of American Chemical Society "; en 1954 deux autres préparations, celles d'ISLER (37) et de HIRS - CHMANN (36) furent publiées. Toutes ces méthodes ont comme principe une condensation du phytol ou de l'isophytol avec la méthylnaphtoquinone.

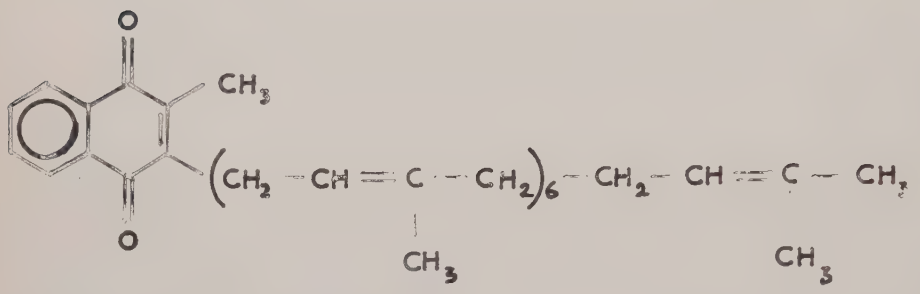
### *1-1-1-2 Vitamine $K_2$*

En 1942, ALMQUIST et ses collaborateurs (1) montrèrent que la vitamine K peut avoir une origine extra-alimentaire et être élaborée dans le côlon par la flore microbienne saprophyte et en particulier par Escherichia Coli.

Cette nouvelle vitamine a été extraite pour la première fois (52) de la farine de poisson ayant subi une putréfaction bactérienne; elle fut dénommée vitamine $K_2$.

Sa constitution indiquée en 1940 par DOISY (9) fut en 1957 corrigée et fixée par ISLER (38); elle répond

à la formule brute $C_{46}H_{64}O_2$ : c'est la méthyl-2 difarnésyl-3 naphtoquinone-1,4 ( ou farnoquinone ).



La synthèse de cette substance fut publiée la même année par ISLER (38).

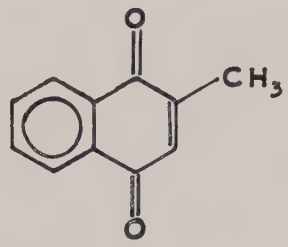
### *1-1-2 SUBSTANCES DE SYNTHESE*

#### *1-1-2-1 Ménadione*

De nombreux auteurs (27) ont cherché quels étaient les groupements chimiques responsables de l'activité vitaminique K :

- Le noyau naphtoquinonique n'est pas absolument indispensable; il semble néanmoins jouer un rôle très important.
- La substitution d'un groupement méthyle en 2 est capitale. Une chaîne plus longue en même position détruit l'activité.
- La chaîne latérale en 3 paraît moins utile.

Ces considérations conduisirent FIESER (26) à synthétiser la méthyl-2 naphtoquinone-1,4 appelée encore ménadione ou vitamine $K_3$



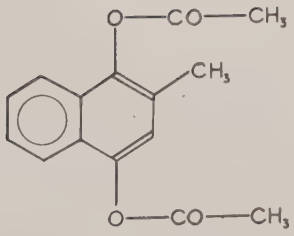

Son activité est supérieure à celle des vitamines naturelles. Elle serait alkylée dans l'organisme par une chaîne latérale (53).
En raison de sa meilleure accessibilité on l'emploie maintenant comme étalon d'activité :
Le tableau I permet de comparer les activités des vitamines $K_1$, $K_2$ à celle de la $K_3$ chiffrée à 1000 unités/mg.

| molécules | équivalence |
|---|---|
| vitamine $K_3$ | 1.000 unités/mg |
| vitamine $K_1$ | 500 unités/mg |
| vitamine $K_2$ | 300 unités/mg |

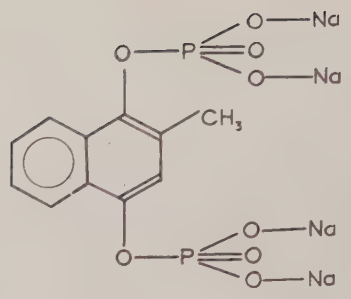
tableau I

### 1-1-2-2 Vitamines $K_4$, $K_5$, $K_6$, $K_7$

Les vitamines naturelles et la ménadione étant liposolubles des molécules hydrosolubles furent synthétisées: il s'agit de dérivés susceptibles de conduire facilement à la ménadione par oxydation. On leur a donné les noms de vitamines $K_4$, $K_5$, $K_6$ et $K_7$ ( 14 - 64 - 73 - 72 ). Leurs formules sont représentées dans le tableau II.

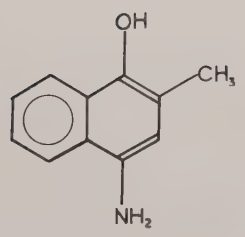



diacétate

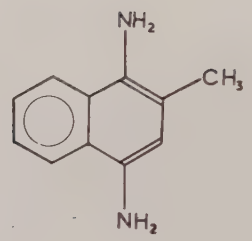



diphosphate

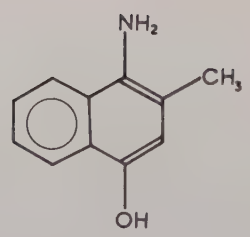
vitamine $K_4$




vitamine $K_5$




vitamine $K_6$




vitamine $K_7$

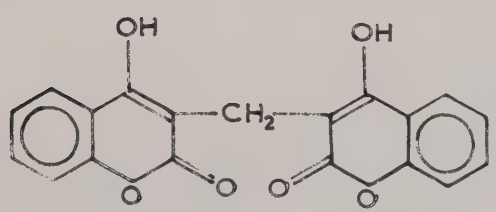
*Tableau II*
*vitamines K hydrosolubles*

## *1-2 ANTI-VITAMINES K*

### *1-2-1 SUBSTANCES NATURELLES*

En 1941, CAMPBELL et LINK (13) isolèrent la première substance anti-vitaminique K à partir des fourrages fermentés responsables du syndrôme hémorragique des bovidés que SCHOFIELD avait décrit dix ans auparavant sous le nom de << Sweet clover disease * >>.

Il s'agit de la méthylène-3,3' bis-hydroxy coumarine plus connue sous le nom de Dicoumarol




Sa synthèse a été faite par LINK en 1945 (47).

* maladie du mélilot gâté.

### *1-2-2 SUBSTANCES DE SYNTHESE*

Grâce au dicoumarol, la thérapeutique s'enrichissait d'un remède très efficace et précieux.

Pourtant, on devait rapidement s'apercevoir des dangers de son utilisation dûs à des surdosages par accumulation dans l'organisme.

Il s'agissait dès lors de trouver le remède idéal susceptible de prévenir les thromboses sans provoquer d'hémorragies irréversibles.

Ces recherches ont été conduites simultanément par STAHMANN, HUEBNER, LINK (63), par JANSEN (39), par von KAULLA (41), par LEHMANN (44) et par MENTZER en collaboration avec MEUNIER (57), puis plus tard avec LECOQ, BILLET, MOLHO et DAT XUONG (55).

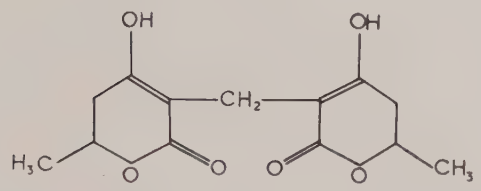
Néanmoins les voies choisies pour arriver à ce but ont été nettement différentes :

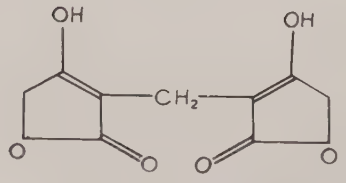
#### *1-2-2-1 Travaux de JANSEN, JENSEN et KAULLA*

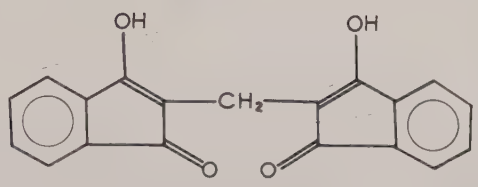
Ces auteurs ont été guidés dans leurs recherches par la conception suivante : l'action physiologique serait avant tout liée à la présence d'un groupement fonctionnel donné.

Comme le dicoumarol est une hydroxy-4 pyrone-1 bis-méthylénique-3, on pouvait en effet se demander dans quelle mesure d'autres hydroxy-4 pyrones présenteraient des propriétés physiologiques analogues.

En conséquence, les auteurs hollandais ont préparé les composés suivants :



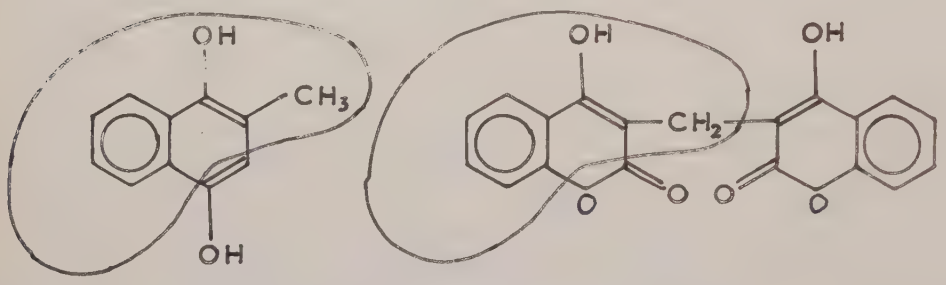

Aucun de ces composés n'ayant présenté des propriétés anticoagulantes, JANSEN et JENSEN ont conclu à une action anti-vitaminique K liée d'une façon spécifique à la molécule de dicoumarol et supprimée par de faibles changements structuraux.

Les travaux de KAULLA sur d'autres pyrones et en particulier sur les coumarines semblèrent confirmer cette conclusion.

### *1-2-2-2 Travaux de MENTZER*

A la même époque, sans connaître les résultats obtenus dans les autres pays, MENTZER et ses collaborateurs ont abordé le problème sous un angle légèrement différent. Selon leur hypothèse, l'action vitaminique ou anti-vitaminique K devait être liée avant tout à une configuration spatiale donnée de la molécule, bien plus qu'à la présence de tel groupement fonctionnel.

En comparant la méthyl-2 naphtohydroquinone (I) et son antagoniste le dicoumarol (II), on est frappé par l'existence d'un groupement d'atomes commun encadré sur les formules ci-dessous :



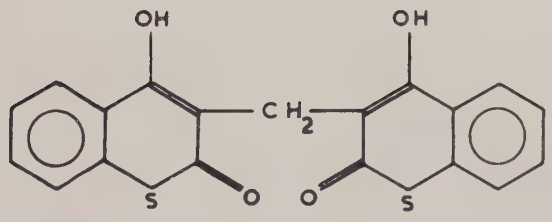

I II

Cette constatation fondamentale conduisit MENTZER à préparer divers modèles moléculaires dans lesquels cette zone commune est conservée ( tableau III ).

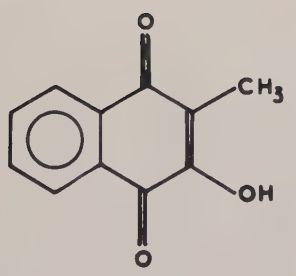
- La synthèse d'isostères soufrés des coumarines amena cet auteur à la découverte du " dithiocoumarol " ( III ) dont l'action anti-vitaminique K est de l'ordre du dixième de celle du dicoumarol naturel.

- Puis par doublement moléculaire, il obtint respectivement à partir du phtiocol (IV) et de la méthyl-3 chromone (V), le " diphtiocol " (VI) et la " dichromone " (VII) qui possèdent toutes deux une activité anti-vitaminique K.

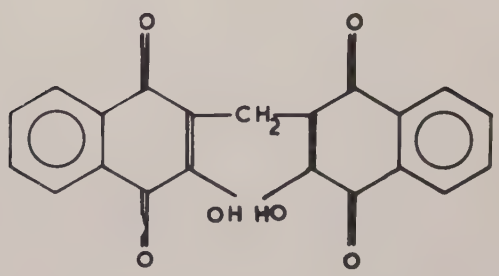
- Enfin, en étendant la notion de " cycles potentiels " à la série des anti-vitamines K, MENTZER s'aperçut que l'antagonisme pour la vitamine K peut se manifester également en l'absence de symétrie : autrement dit, la modification de l'une des moitiés d'une molécule double n'entraine pas la suppression de l'activité anti-vitaminique. En poursuivant ses recherches dans la voie de la simplification, MENTZER aboutit à la phényl-2 indane-dione-1,3 (VIII, forme énolique ) plus connue en thérapeutique sous le nom de pindione, médicament plus maniable et moins dangereux que le dicoumarol.



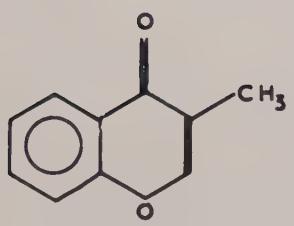

III



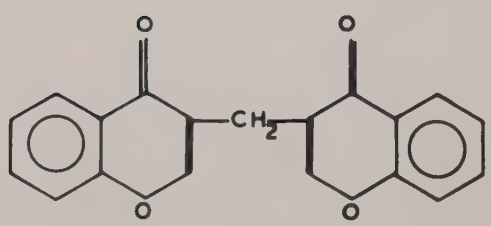

IV



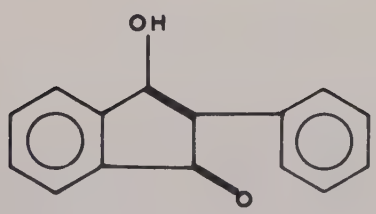

VI




V




VII



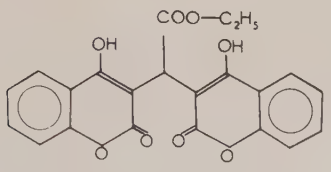

VIII

*Tableau III*

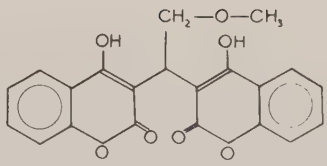
### 1-2-2-3 Médicaments anti-vitaminiques K

A l'instigation de MENTZER, de nombreuses substances furent synthétisées. Quelques unes, répondant aux qualités recherchées, occupent une place de choix en thérapeutique.
Nous les avons classées pour mémoire dans le tableau IV.

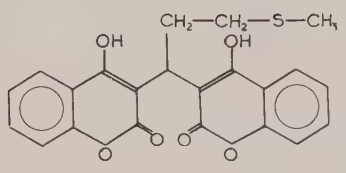
## I DERIVES SYMETRIQUES (dicoumariniques)




tromexane



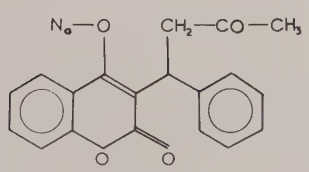

dicoumoxyl



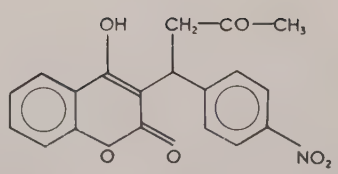

thiocoumar

## II DERIVES ASYMETRIQUES

### 1 Dérivés de la coumarine

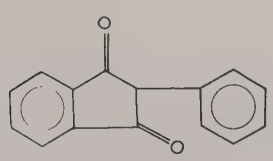



warfarine

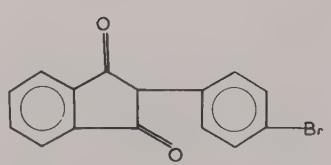



sintrom

### 2 Dérivés de l'indane—dione




pindione




fluidane

*Tableau IV*
*médicaments anti—vitaminiques K*

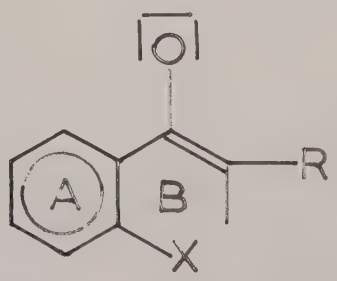
## 1-3 STRUCTURE ET ACTIVITE

Nous ne saurions mieux faire que de rappeler ici les différentes hypothèses émises par ceux qui se sont penchés sur ce problème et en particulier M. MENTZER et, tout récemment, GAULTIER et HAUW.

### 1-3-1 TRAVAUX DE MENTZER

Nous avons déjà indiqué les hypothèses qui guidèrent MENTZER dans la synthèse de molécules anti-vitaminiques K ( v.p. 13 ).
Des résultats obtenus, MENTZER, pouvait dire (54) :

"..... En fin de compte, le squelette fondamental des vitamines K et de leurs antagonistes peut être schématisé de la façon suivante :




Pour que des composés puissent manifester des propriétés vitaminiques K, il faut que R soit un radical méthyle.
Un autre trait commun à toutes les molécules actives est la présence, au sommet du noyau B d'un atome polaire d'oxygène. Cet atome peut appartenir à un groupement énolique ou cétonique, peu importe, pourvu que la tautomérie céto-énolique puisse se manifester. En bloquant l'atome d'oxygène sous forme de groupement méthoxy ou acétoxy, ou encore en empêchant la cétone de se transformer en énol par substitution

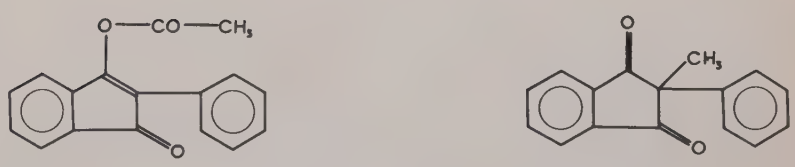
du carbone voisin, l'action disparaît.
Ainsi la phényl-indane-dione est active à condition de pouvoir subir la tautomérie céto-élonique. L'acétylation de l'énol ou encore la fixation d'un méthyle en 2 à côté du phényle empêche cette tautomérie et supprime les propriétés anti-vitaminiques K " ( tableau V )

**Système réversible céto-énolique doué d'activité**

phényl-2 indane-dione-1,3 ( forme énolique )

phényl-2 indane-dione-1,3 ( forme cétonique)

**Formes figées ( inactives )**




acétyl-1 phényl-2 indane-dione-1,3

méthyl-2 phényl-2 indane-dione-1,3

*Tableau V*

Sur ces données, MENTZER esquissait une interprétation de l'action anti-vitaminique K en ces termes :
"... Si nous admettons avec RYDON que les liaisons chimiques conditionnant les phénomènes biologiques sont très souvent dues à des associations de dipôles etc... nous comprenons pourquoi certaines substances doivent avoir une forme très stricte pour pouvoir exercer leur action.
L' attraction dipôle - dipôle diminue très rapidement avec la distance : pour qu'elle puisse néanmoins se manifester il faut que les molécules qui doivent réagir puissent s'appliquer ( à 3 Å environ ) les unes contre les autres* c'est-à-dire que leur forme soit strictement délimitée; la partie active de l'un des partenaires du système doit donc pouvoir épouser très exactement les contours du système complémentaire. Or dans les molécules d'anti-vitamine K, à l'image d'ailleurs des antigènes, l'action est nécessairement liée à une configuration morphologique très stricte.
D'autre part, ces molècules sont également des dipôles grâce à l'atome d'oxygène qui doit avoir deux électrons disponibles.
Il est donc probable que ces composés agissent en groupant autour d'eux d'autres dipôles responsables de la synthèse de la prothrombine. Dans ces conditions, la force de liaison entre les deux dipôles est fonction dela nature de R. Si R est un méthyle, ces liaisons sont relativement lâches; c'est le cas des vitamines K. Dans ce cas, ces liaisons serviraient simplement à mobiliser les constituants protéinogènes du système de coagulation. Elles pourraient ensuite se rompre pour permettre la combinaison entre eux de ces constituants. Si au contraire, R est plus complexe, la molécule peut grouper les mêmes constituants protéinogènes, mais dans ce cas la combinaison peut devenir irréversible, c'est à dire qu'il peut apparaître, entre l'anti-vitamine K et le dipôle attiré par elle, une véritable liaison de covalence incapable de se rompre " .

* Les intéractions dipôle - dipôle diminuent moins rapidement que les autres forces de dispersion : il est donc possible qu'aux distances de l'ordre de 3 Å ce ne soit pas uniquement ces intéractions dipôle - dipôle qui interviennent.

## *1-3-2 TRAVAUX DE GAULTIER ET HAUW*[*]

GAULTIER et HAUW, comme nous l'avons dit, ont entrepris l'étude des structures cristallines d'une série de dérivés naphtoquinoniques dans le but précis d'apporter aux biochimistes des modèles moléculaires complets.

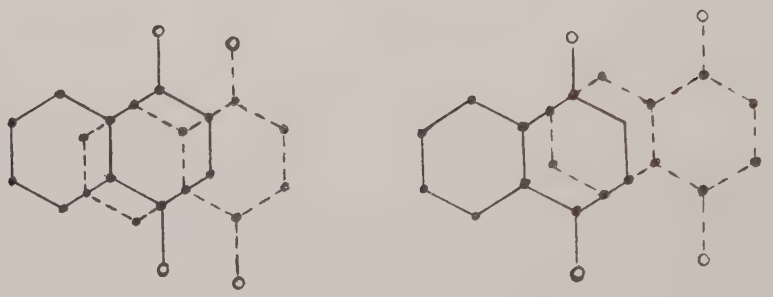
Ils ont analysé non seulement les structures de la molécule elle-même, mais aussi son environnement au sein du cristal.
Ainsi, pour chaque composé étudié, ils déterminent les longueurs de liaisons intramoléculaires, les longueurs et les directions de liaisons intermoléculaires de faible énergie ( liaison hydrogène, liaison par transfert de charge, force de Van der Walls ). Ces renseignements permettent de connaître la configuration des orbitales électroniques des atomes.
GAULTIER et HAUW précisent également l'organisation de l'édifice cristallin tout entier et notamment le mode d'empilement ( stacking ) des molécules.
Ils ont donc étudié la conformation et les axes réactionnels de diverses molécules de la série naphtoquinonique ( 1-4 ) et recherché les caractères permanents des dérivés agissant sur la coagulation sanguine.

### *1-3-2-1 Importance de " l'empilement moléculaire "*

Les structures des composés actifs présentent toutes un empilement moléculaire ( Stacking ) très frappant

[*] GAULTIER et HAUW - Faculté des Sciences de BORDEAUX
communication personnelle.

qui ne se retrouve pas dans d'autres composés aromatiques analogues.



*Exemples d'empilements moléculaires*

GAULTIER et HAUW ont indiqué deux conditions nécessaires et suffisantes pour que le phénomène de Stacking se produise :

- l'existence d'un enchaînement à circulation d'électrons $\pi$ ( noyau aromatique ) contigu à un cycle saturé ou insaturé.
- la présence d'un groupement polarisable en position 1 ( soit l'oxygène, ou l'hydroxyle etc...); le groupe polaire situé en 4 n'ajoute rien à la propriété de former des empilements moléculaires.

Ces auteurs ont montré par l'étude des relations faciés cristallin - structure, qu'aux directions de stacking devaient correspondre des liaisons très intenses ce qui leur a permis de conclure à la possibilité d'une fixation de " type épitaxique " de la molécule active sur le récepteur par l'intermédiaire de " liaisons de stacking ", mais ils ne pensent pas que le mode d'empilement lui-même soit d'une grande importance ( bien qu'il soit unique pour les anti-vitamines K connues, il est très variable pour les vitamines K ).

### *1-3-2-2 Rôle des atomes d'oxygène $O_1$ et $O_4$*

Le substituant en position 2 n'influe pas sur la possibilité des atomes d'oxygène $O_1$ ou $O_4$ de se lier à des molécules voisines dans le cristal ( ces liaisons peuvent intéresser soit $O_1$ soit $O_4$ , soit $O_1$ et $O_4$ ).

L'oxygène cétonique a la configuration sp ( exceptionnellement $sp_2$ dans la bromo-2 naphtoquinone-1,4) et l'axe réactionnel est alors dirigé suivant la direction C=O .
L'oxygène énolique $sp_2$ peut se lier indifféremment suivant l'axe de l'orbitale hybride ou de l'orbitale non hybride ( deux axes réactionnels possibles ).

Pour GAULTIER et HAUW la céto-énolisation ( observée dans la chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ) ne semble pas intervenir directement dans l'antagonisme ; ces phénomènes seraient liés aux possibilités d'intéraction des groupements fixés en 2, plutôt qu'à celles des oxygènes $O_1$ et $O_4$ .

### *1-3-2-3 Importance du substituant 2*

L'atome d'halogène situé en 2 a toujours la configuration sp ; il est lié à une molécule voisine.
Il s'agit de liaisons par transfert de charges du type X....O, ou de liaisons hydrogène X....H-C.
Ces liaisons sont dirigées suivant l'axe C-X ou perpendiculairement au plan moléculaire.
Les groupements méthyle à caractère électropositif pourraient donner une liaison de type électrostatique, contrairement à la chaîne éthyle par exemple.

GAULTIER et HAUW concluent donc à l'importance fondamentale du substituant en position 2 pour l'orientation de l'activité biologique des naphtoquinones-1,4.

1-3-2-4 Rôle du substituant 3

Placés en 3 les groupements —OH et —$NH_2$ se comportent de façon rigoureusement identique : ils donnent une seule liaison hydrogène intermoléculaire, le deuxième atome H de $NH_2$ n'entrant jamais en jeu.
Autrement dit le remplacement en position 3 de —OH par —$NH_2$ ne modifie pas les axes réactionnels de la molècule cris - talline.

GAULTIER et HAUW, remarquons-le, substituent à la notion d'analogie moléculaire ( réduite à la forme de la molécule elle-même ) celle d'analogie structurale ( liée aux axes réactionnels prolongeant à distance l'action de la molécule ).
Ces considérations leur permettent de confirmer et de compléter les conceptions de MENTZER, ainsi que de formuler les hypothèses qui sont à l'origine de notre travail.

# CHAPITRE II

# VITAMINES K ET COAGULATION

## 2-1 INTRODUCTION

Qu'elles soient d'origine exogène ($K_1$) ou endogène ($K_2$), les vitamines K naturelles sont absorbées par la muqueuse intestinale en dépit de leur insolubilité dans l'eau grâce à la modification de tension superficielle produite par les sels bilaires ( 11 ).
Parvenues au foie, ces vitamines K vont y être mises en réserve pour servir à la formation de quatre facteurs qui occupent une place prépondérante dans le processus de la coagulation sanguine :

- la prothrombine
- la proconvertine
- le facteur Stuart
- le facteur prothromboplastique B.

Afin de mieux définir le rôle de ces quatre facteurs dans la coagulation et, par suite, celui des vitamines K et de leurs antagonistes, un rappel de ce phénomène physiologique s'impose. Cette étude nous permettra en outre de justifier, d'une part le choix des tests que nous avons mis en oeuvre pour apprécier l'activité des substances étudiées, et, d'autre part, les précautions dont nous nous sommes entourés pour éviter d'entâcher d'erreurs les résultats de ces tests.

## 2-2 PHYSIOLOGIE DE LA COAGULATION

Comme le souligne ROSKAM il faut éviter de confondre le phénomène purement biochimique de coagulation sanguine et le phénomène physiologique d'hémostase dans lequel la formation du caillot intervient certes, sans en expliquer pour autant tous les aspects (68).

L'hémostase, rappelons-le, est un mécanisme de défense qui " in vivo ", s'oppose à toute hémorragie par rupture ou lésion d'un vaisseau sanguin.
Elle résulte d'une série de phénomènes interdépendants - vasculaires, tissulaires, cellulaires et humoraux - qui mettent en jeu des ions $Ca^{++}$ et diverses molécules de nature protidique ou lipo-protidique. Celles-ci participent à titre de substrats ou d'enzymes à la chaîne de réactions autocatalytiques qui aboutit à la constitution du caillot puis, ultérieurement, à sa lyse, une fois l'hémostase assurée.
Il est commode de partager le phénomène général de l'hémostase en trois temps principaux qui sont :

1- Le temps pariétal,
au cours duquel se réalisent les conditions favorables à l'élaboration du caillot.

2- Le temps plasmatique : coagulation proprement dite,
conduisant à la formation du caillot au terme d'un processus que l'on a coutume de diviser en trois étapes :

- la thromboplastinoformation
- la thrombinoformation
- la fibrinoformation

3- Le temps thrombodynamique, correspondant à l'évolution du caillot, celle-ci se faisant en deux phases :

- la rétraction, au cours de laquelle le caillot acquiert une solidité qui le rend efficace.
- la fibrinolyse, après avoir joué son rôle, le caillot devient inutile et est éliminé.

La coagulation, observable " in vitro " fait donc partie du phénomène plus général de l'hémostase dont elle constitue le deuxième temps. C'est sur cette phase facile à observer que sont fondés de nombreux tests permettant d'apprécier l'activité de certains facteurs qui conditionnent une hémostase normale.
Aussi est-ce cette phase qui retiendra principalement notre attention. Cependant, l'hémostase est un tout, un phénomène continu dont les étapes arbitrairement délimitées pour clarifier les exposés sont intimement intriquées. Pour explorer la coagulation proprement dite, le biologiste doit donc tenir compte des phénomènes qui interviennent au cours du premier temps de l'hémostase.

*2-2-1 TEMPS PARIETAL*

D'un point de vue purement biologique il importe de savoir que dès qu'un vaisseau se trouve endommagé sous l'effet d'une cause externe, à côté d'actions mécaniques ( vaso-constriction ) on assiste :

1- à la suppression de la non-mouillabilité physiologique des endothéliums vasculaires.
Ce phénomène dit de " contact " va avoir pour conséquence :

a) L'attraction et la modification morphologique des plaquettes ( thrombus blanc ).

b) La neutralisation par adsorbtion de facteurs inhibiteurs qui dans le sang circulant sont les antagonistes de facteurs activateurs de la coagulation.

c) La modification de la structure moléculaire de plusieurs profacteurs inactifs qui sont amenés à l'activité biologique ( Hageman - P.T.A.)

2- à la libération d'une thromboplastine tissulaire inactive qui va pouvoir amorcer la thrombinoformation après avoir été activée par trois facteurs plasmatiques ( convertine - facteur Stuart - accélérine )

Ces différentes actions bio-physiques ou biochimiques concourent à déclencher la coagulation. Leur importance justifie les précautions dont doit s'entourer le biologiste pour les minimiser, voir les éliminer.

### *2-2-2 COAGULATION PROPREMENT DITE*

Le temps où l'on s'en tenait encore aux théories classiques énoncées par les auteurs allemands SCHMIDT et MORAWITZ n'est pas éloigné. Cependant les nombreux travaux entrepris sous l'impulsion de A.J. QUICK, ont précisé le canevas initial donné par MORAWITZ (schéma 1).

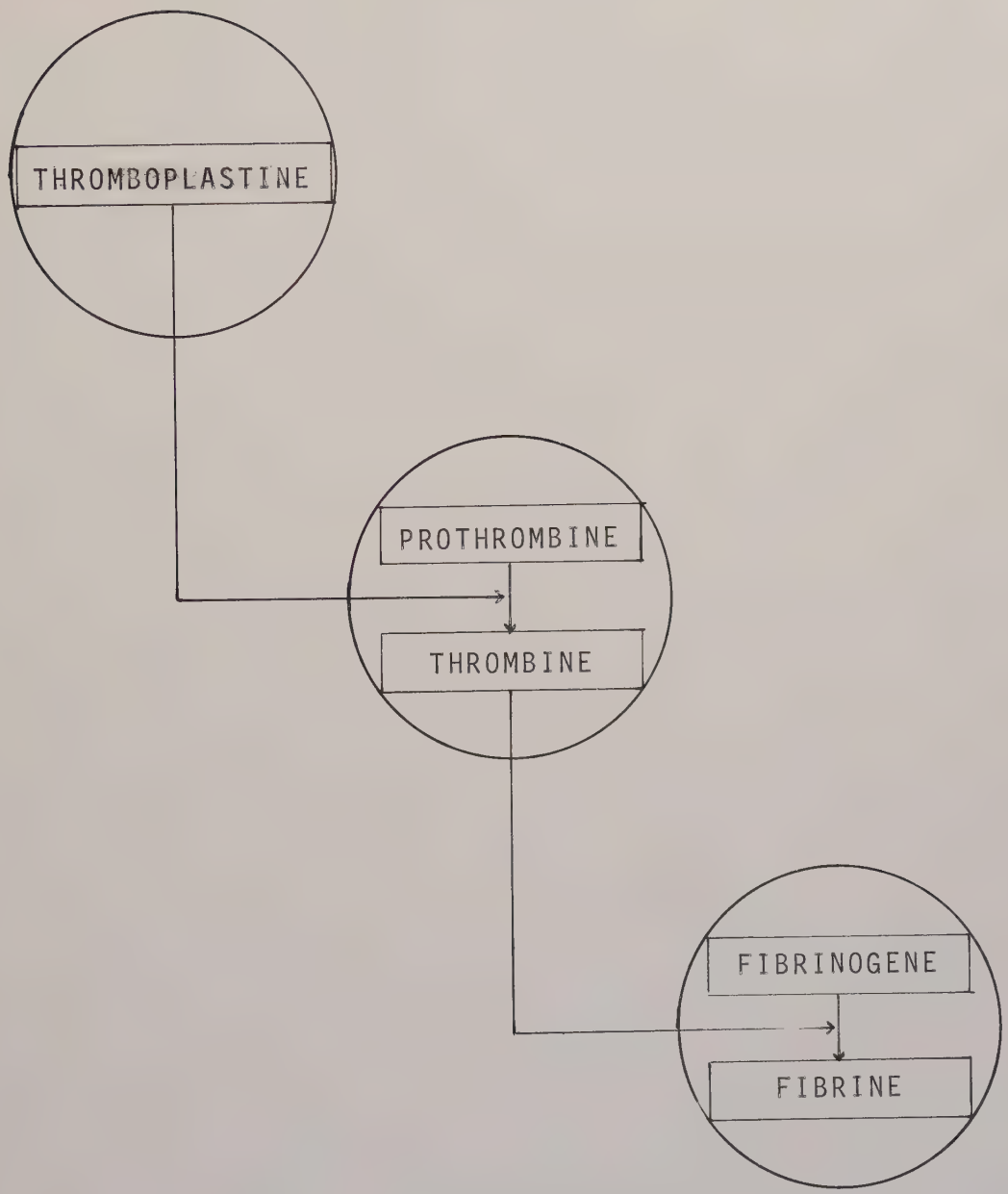



*Schéma 1*

Comme le montre ce schéma encore valable aujourd'hui dans ses grandes lignes, la constitution du caillot résulte de

la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble sous l'action de la thrombine. Cet enzyme, inexistant normalement dans le sang, provient de la dégradation d'un substrat, la prothrombine plasmatique, par un système enzymatique : les thromboplastines.

Ce processus comprend donc trois étapes qui se succèdent dans l'ordre chronologique suivant :

- la formation des thromboplastines
- la formation de la thrombine
- la formation de la fibrine.

Bien entendu toutes ces divisions sont arbitraires, chaque étape plongeant ses racines dans la précédente.

### 2-2-2-1 Thromboplastinoformation

Le sang recueilli en évitant tout contact avec du suc tissulaire peut coaguler : cela prouve l'existence d'une thromboplastine plasmatique endogène qui complète l'action de la thromboplastine exogène tissulaire libérée au temps pariétal.

La thromboplastine plasmatique est élaborée, en dépit de nombreux inhibiteurs, grâce à la participation de substrats, d'activateurs et d'accélérateurs dont on trouvera la liste* et les principaux caractères dans le tableau VI.

* Le facteur Stuart et l'accélérine seront étudiés plus loin ( tableau VIII ).

| FACTEURS | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | DENOMINATION COURANTE | A | B | P.T.A. | HAGEMAN | N° 3 PLAQUETTAIRE |
| | NOMENCLATURE INTERNATIONALE | VIII | IX | XI | XII | 3 |
| NATURE | | $\beta_2$ globuline | $\beta_2$ globuline | $\beta_2$ globuline | | phospholipidique |
| ORIGINE | | | hépatique | | | plaquettaire |
| ROLE DE LA VITAMINE K | | nul | indispensable | nul | nul | nul |
| ACTIVATION | | | par les facteurs XI et XII | par contact | par contact | libéré des plaquettes |
| CONSOMMATION PAR LA COAGULATION | | oui | non | partiellement | non | oui |
| CHAUFFAGE A 56° | | labile | $\pm$ stable | labile | labile | stable |
| CONSERVATION A 5° | | labile | stable | stable | stable | stable |
| ADSORBTION SUR $BaSO_4$ | | - | + | - | - | - |

*Tableau VI*

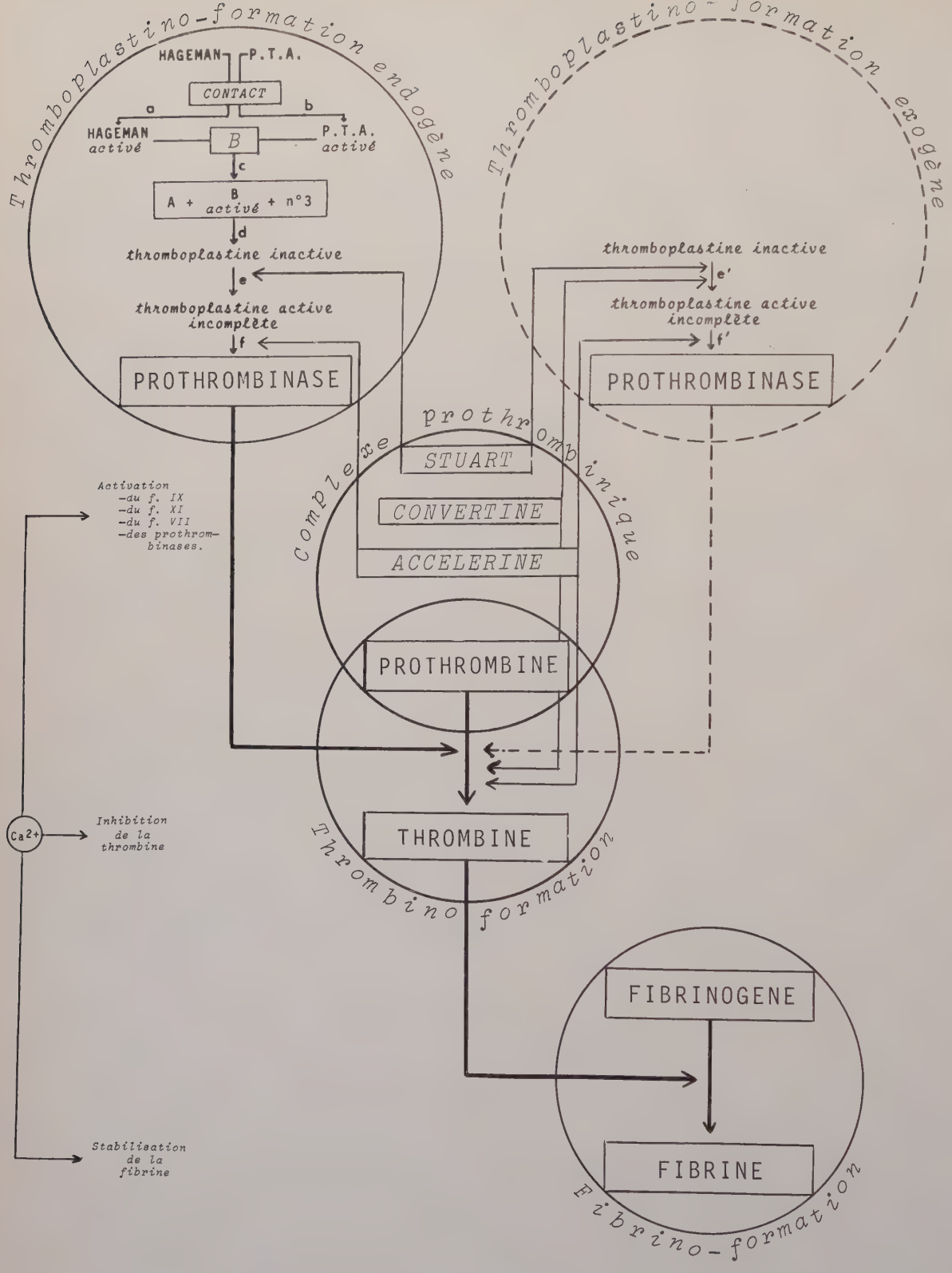



Tableau VII
schéma d'ensemble de la coagulation

La formation de la thromboplastine endogène peut se schématiser ainsi ( tableau VII ) :

a) Le contact avec une surface mouillable comme le récipient dans lequel est recueilli le sang, provoque, en présence de calcium ionisé, une modification du facteur Hageman qui, d'inactif sous sa forme plasmatique habituelle est activé.

b) Parallèlement le facteur P.T.A est activé par un processus identique.

c) Le facteur Hageman activé et le facteur P.T.A activé vont agir en présence de calcium ionisé sur le facteur prothromboplastique B et le rendre actif.

d) Le facteur "B" activé s'unirait alors avec le facteur prothromboplastique "A" puis avec le facteur n°3 plaquettaire pour aboutir à la formation d'une thromboplastine endogène inactive. Celle-ci, appelée également premier complexe intermédiaire, présente une analogie avec la thromboplastine tissulaire.

e) La thromboplastine endogène inactive, activée par le facteur Stuart, devient une thromboplastine endogène active incomplète ( deuxième complexe intermédiaire ).

f) Celle-ci sous l'action de l'accélérine est transformée très rapidement en une thromboplastine active complète ou prothrombinase.

La prothrombinase ainsi élaborée est en place pour permettre la transformation efficace de la prothrombine en thrombine.
En effet, la première prothrombinase, formée à partir des substances tissulaires, est quantitativement insuffisante pour assurer une coagulation normale. Par contre elle va pouvoir l'amorcer.

Lorsque les tests d'exploration de la coagulation visent l'étude de la thromboplastinoformation, seule la thromboplastine plasmatique néoformée doit intervenir. Il faudra donc éviter toute souillure des prélèvements sanguins par l'exudat tissulaire.

### *2-2-2-2 Thrombinoformation*

La formation de la thrombine résulte de la scission enzymatique de la molécule de prothrombine par la prothrombinase en présence de facteurs activateurs ( convertine, accélérine ) et d'inhibiteurs ( héparine ).

Ce processus diastasique se déroule en plusieurs étapes et correspond à une dégradation catabolique de la prothrombine, pouvant emprunter plusieurs voies. Celles-ci diffèrent par les réactions biochimiques qui s'y déroulent, par les facteurs qui y participent et par l'activité des molécules auxquelles elles aboutissent. La voie principale conduit à la thrombine.

### *2-2-2-3 Fibrinoformation*

C'est le dernier acte de la coagulation proprement dite.
Le fibrinogène est une protéine se présentant en une molécule de forme allongée. Les réactions enzymatiques qui vont intervenir sous l'influence de la thrombine vont détacher du fibrinogène des éléments peptidiques et permettre à ce fibrinogène modifié de se polymériser. Cette polymérisation a lieu par étapes avec la formation de molécules intermédiaires pour donner une nouvelle protéine fibreuse insoluble : la fibrine.

Signalons qu'interviennent dans cette réaction de protéolyse limitée des facteurs activateurs ( plaquettaires essentiellement ) et inhibiteurs.

L'apparition de la trame de fibrine qui, dans ses mailles, va enserrer les éléments figurés du sang et constituer le caillot, confère une importance extrême à ce dernier temps de la coagulation proprement dite. Pour le biologiste c'est le signe qui marque la fin des tests d'exploration de la coagulation.

x x

x

Remarque : le " complexe prothrombinique "

Sous ce terme, on désigne un ensemble de quatre facteurs plasmatiques ayant en commun la propriété d'agir sur le temps de Quick (v.p.68 ).

Ces facteurs peuvent être divisés en deux groupes :

- Un substrat : la prothrombine (II)
- Trois activateurs : l'accélérine* (VI)
  la convertine* (VII)
  le facteur Stuart (X)

Le complexe prothrombinique, que l'on trouve présent soit directement, soit indirectement sous la forme de plusieurs ou d'un seul de ses facteurs au niveau de la thromboplastinoformation et de la thrombinoformation , constitue le véritable << pivot >> de la coagulation.

Nous avons présenté les caractères principaux de ces facteurs dans le tableau VIII.

* Conformément à la nouvelle tendance nous ne ferons aucune différence entre la pro-accélérine et l'accélérine d'une part, la pro-convertine et la convertine d'autre part.

| FACTEURS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | DENOMINATION COURANTE | PROTHROMBINE | ACCELERINE | CONVERTINE | STUART |
| | NOMENCLATURE INTERNATIONALE | II | VI | VII | X |
| NATURE | | $\alpha_2$ globuline | $\beta$ globuline | $\alpha$ globuline | $\alpha$ globuline |
| ORIGINE | | hépatique | hépatique | hépatique | hépatique |
| ROLE DE LA VITAMINE K | | indispensable | nul | indispensable | indispensable |
| DUREE DE VIE | | $\leq$ 72 h | $\leq$ 24 h | $\leq$ 24 h | $\leq$ 72 h |
| CONSOMMATION PAR LA COAGULATION | | oui | oui | non | non |
| CHAUFFAGE A 56° | | stable | labile | stable | stable |
| CONSERVATION A 5° | | stable | labile | stable | stable |
| ADSORPTION SUR $BaSO_4$ | | + | - | + | + |

*Tableau VIII*
*facteurs du complexe prothrombinique*

## 2-3 IMPORTANCE DES VITAMINES K

En participant à la synthèse hépatique des facteurs* II, VII, IX et X les vitamines K sont indispensables à une coagulation normale.

On peut à la lueur de ce qui précède, montrer le lieu d'action des vitamines K et leur retentissement sur le phénomène général de la coagulation, par le schéma 2.

A l'état normal le foie effectue une synthèse permanente des facteurs adsorbables. Et, au fur et à mesure de leur formation, ces facteurs sont détruits par protéolyse, probablement dans le poumon, comme l'ont montré ANDRUS et ses collaborateurs (4). Ceci explique l'effondrement rapide du taux de l'activité prothrombinique lorsque la synthèse vient à être perturbée.

Un mécanisme régulateur, humoral ou nerveux, commande à la fois l'intensité de la synthèse et celle de la protéolyse. L'activité prothrombinique est ainsi maintenue à un taux constant. L'existence d'un tel mécanisme régulateur supposé par SOULIER (76), a été prouvée en 1964 par ANDERSON et BARNHART (3).

* Ces facteurs ont en commun la propriété d'être adsorbés par les gels minéraux.

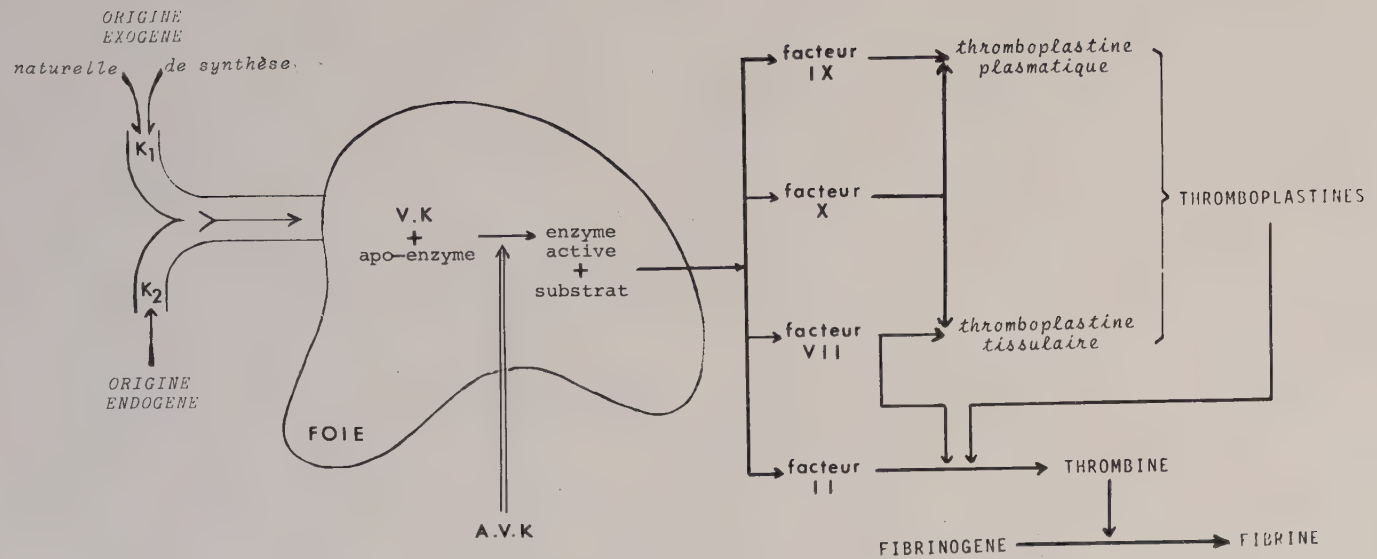



*Schéma 2*
*lieu d'action des vitamines K et leur retentissement sur la coagulation*

## 2-4 MECANISME D'ACTION BIOLOGIQUE DES VITAMINES K

Si le résultat des réactions biochimiques dans lesquelles les vitamines K interviennent est connu, on sait en revanche fort peu de chose encore sur leur mode d'action. Deux théories principales ont été émises :

### 2-4-1 PREMIERE THEORIE

Il est probable que les vitamines K ( V.K ) agissent comme catalyseurs d'oxydo-réduction de certains enzymes* hépatiques (66).

*V.K + apo - enzyme ⟶ enzyme active spécifique*

Ces enzymes interviennent dans la synthèse des facteurs adsorbables à partir de précurseurs inconnus ou d'un seul substrat. Par l'intermédiaire de la prothrombine celui-ci conduit à d'autres molécules de propriétés physico-chimiques voisines mais d'activité différente ( schéma 2 ).

En cas d'avitaminose K, la concentration en apo-enzyme reste inchangée, mais le groupement prosthétique fait défaut. De faibles quantités de vitamine K suffisent alors pour rétablir le processus de synthèse.

Leur analogie structurale avec les vitamines K, permet de penser que les anti-vitamines K ( A.V.K ) sont susceptibles de se substituer à elles, et, par compétition

* L'enzyme est formée d'un cristalloïde peu spécifique dit co-enzyme et d'une protéine trés fragile spécifique dite apo-enzyme.

de bloquer la réaction :

*A.V.K + apo-enzyme ⟶ complexe sans activité spécifique ( pseudo-enzyme )*

Si on supprime l'administration de l'anti-métabolite, la réaction physiologique réapparaît.

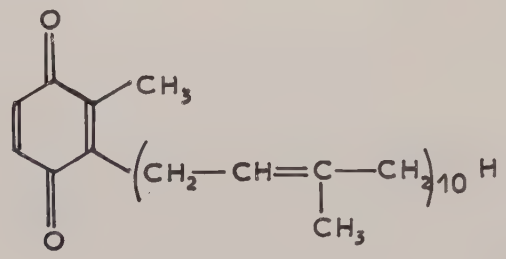
Il en est de même si on administre simultanément le métabolite. Mais, contrairement au cas précédent, la chute de l'activité prothrombinique résultant de cet antagonisme compétitif, est beaucoup plus rebelle à la vitamine K : le rapport des poids d'anti-vitamine à neutraliser et de vitamine nécessaire est beaucoup plus petit que 1 ( index d'inhibition de WOOLLEY ), ce qui est contraire à la loi d'inhibition mutuelle de l'acide para-amino-benzoïque et des sulfamides. En outre, ce rapport est très variable d'une espèce à l'autre. Le lapin présente un " index d'inhibition " inférieur à 0,1.
MEUNIER (56) en donne l'explication suivante :

<< La vitamine K semble éliminée plus vite de l'organisme que l'anti-vitamine, puisque nous voyons des animaux intoxiqués réagir à de très fortes doses de vitamine K que passagèrement, la prothrombine s'abaissant de nouveau après être remontée sous l'influence de ces hautes doses de vitamine ...
Dans cette action des anti-vitamines K, les conditions de leur élimination commandent tout le phénomène et expliquent l'importance des variations individuelles >> .

### *2-4-2 DEUXIEME THEORIE*

Il n'est pas certain que la coagulation soit le seul endroit de l'action des vitamines K (74).
Selon MARTIUS, les vitamines K comme la vitamine E, sont impliquées dans les réactions de phosphorylation oxydative et interviennent dans le transport des électrons. L'administration de vitamine K au poussin carencé élève le taux des phosphorylations des mitochondries hépatiques.

Cette intervention des vitamines E et K dans les processus d'oxydo-réduction est à rapprocher de celle d'une quinone universellement répandue dans les tissus, l'ubiquinone ou coenzyme Q (61)



Il n'est pas interdit de penser dès lors que la biosynthèse des facteurs de la coagulation influencés par les vitamines K, présente une très haute sensibilité à l'absence des molécules riches en énergie ( A.T.P ) dont la synthèse dépend justement des vitamines K.

# DEUXIEME PARTIE

# SYNTHESES DES SUBSTANCES ETUDIEES

Exception faite de la pindione, du phtiocol et de la vitamine $K_1$ que l'on trouve dans le commerce, nous avons réalisé la synthèse des substances étudiées selon les principes et protocoles opératoires suivants ( * ).

* Nous tenons à remercier ici M^me^ HOUSTY pour l'aide qu'elle nous a apportée dans ce travail de synthèse .

# CHAPITRE I

# SYNTHESES

# DE LA BROMO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

# et

# DE LA CHLORO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

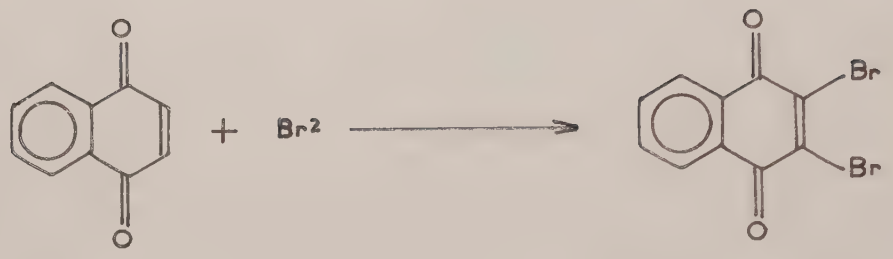
## *1-1 BROMO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4*

Nous avons suivi, pour la préparation de ce composé, la méthode définie par KOMEI MIYAKI et NISABURO IKEDA (42).
On prépare en premier lieu la dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 à partir de la naphtoquinone-1,4 , puis on transforme ce dérivé en bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4.

### *1-1-1 PREPARATION DE LA DIBROMO-2,3 NAPHTOQUINONE-1,4*

#### *1-1-1-1 Principe*

On obtient la dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 par action du brome sur la naphtoquinone-1,4 en milieu acétique en présence d'acétate de sodium fondu (49) (22).




### 1-1-1-2 Protocole opératoire

Dans un ballon de un litre, on dissout 20 grammes de naphtoquinone-1,4 (Fluka ref. A 55921) dans 400 millilitres d'acide acétique glacial, puis 80 grammes d'acétate de sodium fondu. On agite jusqu'à ce que la solution devienne limpide.
On ajoute alors 16 millilitres de brome. Après agitation, on laisse reposer vingt quatre heures.
On verse cette solution dans 1600 millilitres d'eau distillée. Le précipité est rassemblé sur un büchner, puis lavé à l'eau et séché.

Le produit brut ainsi obtenu est dissout dans le minimum d'acide acétique à chaud. On ajoute du noir de carbone et on filtre à chaud.
On recueille la dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 purifiée qui cristallise par refroidissement sous forme d'aiguilles jaunes dont on prend le point de fusion ( 218 - 220° C ).

## 1-1-2 PREPARATION DE LA BROMO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

### 1-1-2-1 Principe

Par action de l'ammoniaque, on transforme la dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 en bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 selon l'équation :

### 1-1-2-2 Protocole opératoire

20 grammes de dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 sont introduits dans un ballon de un litre ( muni d'un réfrigérant à reflux ) avec 770 millilitres d'alcool absolu. On chauffe au bain-marie avec agitation magnétique.
On porte à ébullition et on ajoute goutte à goutte 70 millilitres d'ammoniaque concentrée. Le dérivé dibromé se dissout petit à petit tandis que la solution rougit.
Au bout d'une heure la solution est limpide. On la filtre alors à chaud en recueillant le filtrat dans 4200 millilitres d'eau permuttée : la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 précipite sous forme d'un produit orangé qui sera isolé sur un büchner, lavé à l'eau et séché.

Une fois le produit bien sec, on le redissout dans le minimum d'alcool absolu, on ajoute du noir de carbone et on porte à ébullition. On filtre à chaud en recueillant

le filtrat dans de l'eau distillée : la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 précipite par refroidissement dans l'eau sous forme de cristaux orangés dont on prend le point de fusion ( 208°C ).

Le rendement de cette préparation est de l'ordre de 80 pour cent .

Remarque

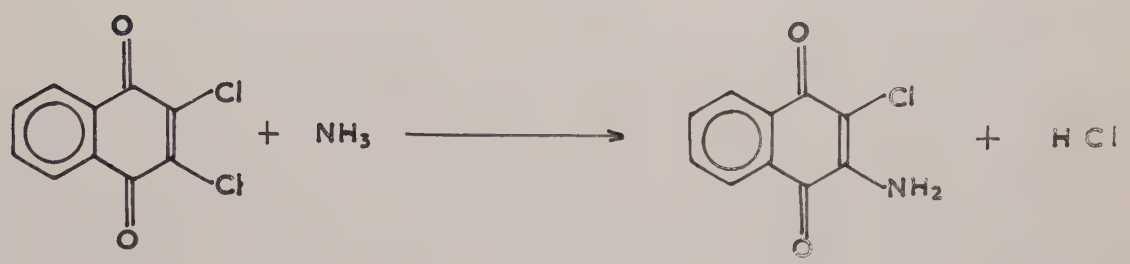
La structure de la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 a été vérifiée, rappelons-le, par des études radiocristallographiques. L'analyse élémentaire n'était donc pas indispensable.

Cette remarque s'applique également à la chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4, à la chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 et à la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4

## 1-2 CHLORO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

### 1-2-1 PRINCIPE

Comme pour le dérivé bromé correspondant, on transforme par action de l'ammoniaque, la dichloro-2,3 naphtoquinone-1,4 en chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 selon l'équation :




### 1-2-2 PROTOCOLE OPERATOIRE

Nous avons suivi le mode opératoire décrit par FRIES et OCHWATT (29).

On procède comme pour la préparation de la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 en partant de 27,6 grammes de dichloro-2,3 naphtoquinone-1,4 ( Fluka rèf. P53086 ) que l'on dissout dans 1200 millilitres d'alcool absolu. La réaction utilise 180 millilitresd'ammoniaque concentrée.

Le produit obtenu après purification par recristallisation se présente sous forme de cristaux orangés dont le point de fusion est de 198°C.

Le rendement est identique à celui obtenu pour la préparation du dérivé bromé correspondant.

# CHAPITRE II

# SYNTHESES

# DE LA BROMO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

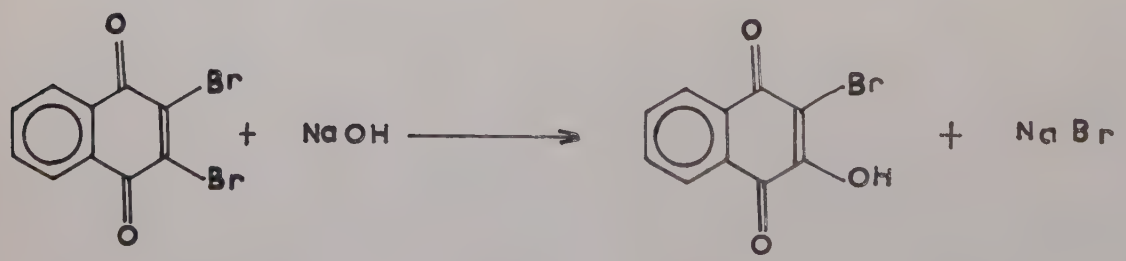
# et

# DE LA CHLORO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

## *2-1 BROMO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4*

### *2-1-1 PRINCIPE*

La dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4 est transformée en bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 par action de NaOH (12) (24) (45) :



L'excès de soude est neutralisé par une solution d'acide chlorhydrique

*2-1-2 PROTOCOLE OPERATOIRE*

Dans un bécher de 400 millilitres on introduit 3,70 grammes de dibromo-2,3 naphtoquinone-1,4. On ajoute 70 millilitres d'alcool absolu et on chauffe en agitant. A cette solution presque bouillante, on ajoute alors une solution de soude préparée préalablement à raison de 3,70 grammes pour 70 millilitres d'eau.
On laisse reposer une demi-heure et on verse dans ce mélange 50 millilitres d'une solution chlorhydrique à 42 pour cent. Il se forme un précipité ocre jaune de bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4.

Ce précipité filtré et séché est redissout dans la même quantité de soude. On filtre à chaud et on ajoute la solution chlorhydrique : on obtient un produit jaune, plus clair que le produit brut et dont le point de fusion est de 198,5°C.

Le rendement de cette préparation est de l'ordre de 80 pour cent.

*2-1-3 ANALYSE ELEMENTAIRE*

Cette analyse s'imposait puisque la structure de la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 n'a pas été faite. On obtenait les résultats suivants :

Analyse ( $C_{10} H_5 O_3 Br$ )

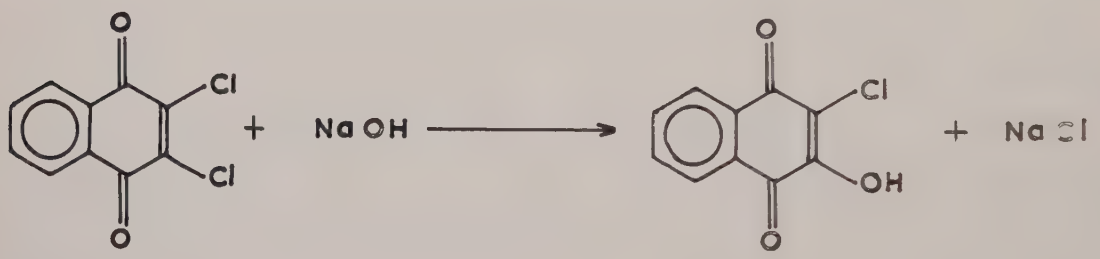
calc % : C 47,43 H 1,97 O 18,93 Br 31,97

trou % : C 46,98 H 2,26 O 18,30 Br 31,44

## 2-2 CHLORO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

### 2-2-1 PRINCIPE

La préparation de ce produit selon la méthode de ZINCKE (85) repose sur le principe déjà appliqué au dérivé bromé correspondant : on part de la dichloro-2,3 naphtoquinone-1,4 que l'on traite par la soude dont l'excès est neutralisé par HCl :




### 2-2-2 PROTOCOLE OPERATOIRE

Il est identique à celui de la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4.

Point de fusion : 214 - 215°C.

# CHAPITRE III

# SYNTHESE

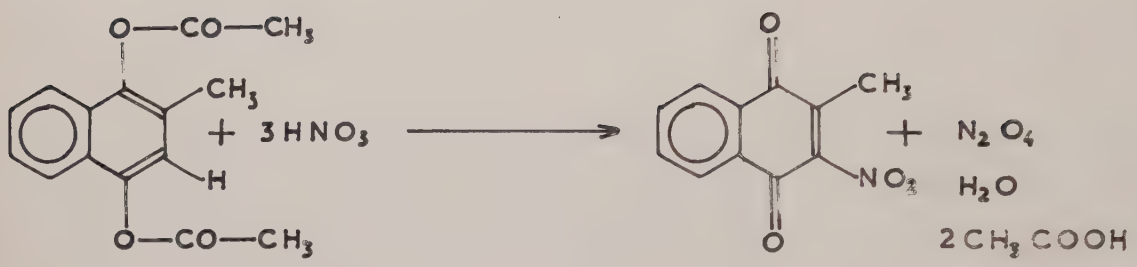
# DE LA METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

Nous avons préparé la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 en suivant la méthode décrite par CARRARA et BONNACI (15).
On prépare tout d'abord la méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4 à partir de la méthyl-2 naphtoquinone-1,4 ( diacétate ), puis on transforme par réduction le dérivé nitré en méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4.

## *3-1 PREPARATION DE LA METHYL-2 NITRO-3 NAPHTOQUINONE-1,4*

### *3-1-1 PRINCIPE*

Par action de l'acide nitrique concentré, on transforme le diacétate de méthyl-2 naphtohydroquinone-1,4 en méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4 selon la réaction globale suivante :




*3-1-2 PROTOCOLE OPERATOIRE*

Dans un ballon de 100 millilitres, on introduit 20 millilitres d'acide nitrique concentré et on chauffe au bain-marie. Lorsque la solution atteint 60°C on introduit par petites fractions 20 grammes de diacétate de méthyl-2 naphtohydroquinone-1,4 ( Fluka rèf. 5570 La ). La réaction étant violente, cette introduction s'étale sur une heure environ en agitant continuellement.
Lorsqu'il n'y a plus de dégagement gazeux à cette température, on laisse refroidir.
Aprẽs filtation, on verse la solution dans 500 millilitres d'eau distillée : la méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4 précipite. On attend quinze minutes environ et on filtre sur creuset de porcelaine. On lave abondamment le précipité pour éliminer tout l'acide nitrique et on le fait sécher.

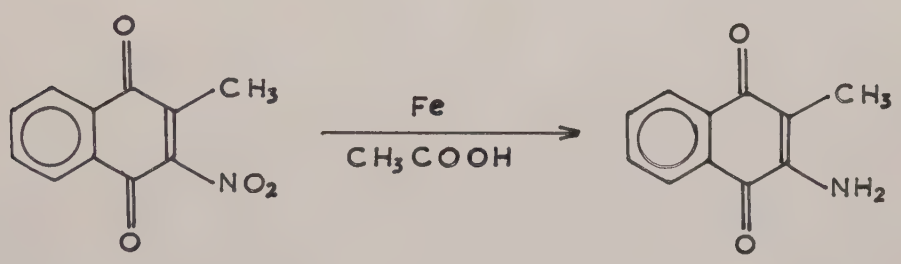
On recristallise dans l'alcool méthylique en chauffant au bain-marie sans dépasser 60°C et en refroidissant brusquement dans l'eau glacée. On obtient des plaquettes jaunes dont le point de fusion est de 121°C.

Le rendement de cette préparation est de 35,6 pour cent.

## 3-2 PREPARATION DE LA METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

### *3-2-1 PRINCIPE*

La méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4, en solution dans l'acide acétique, est réduite par le fer. La méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 formée est extraite par l'éther.




### *3-2-2 PROTOCOLE OPERATOIRE*

Dans un erlenmeyer de 250 millilitres on introduit :

- 1 gramme de méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4
- 3 grammes de fer
- 12 millilitres d'acide acétique
- 40 millilitres d'eau distillée

On agite à l'aide d'un agitateur magnétique rien ne se dissout mais la méthyl-2 nitro-3 naphtoquinone-1,4 jaune devient rouge.

On ajoute 50 millilitres d'éther sulfurique ordinaire et on laisse le dégagement d'hydrogène se poursuivre. Six heures environ après on filtre . Le filtrat est recueilli dans une ampoule à décanter.
Le lendemain, on élimine la phase aqueuse inférieure et on lave l'éther avec de l'eau distillée.
Après plusieurs heures on décante et on filtre la phase éthérée sur sulfate de soude.
Par évaporation de l'éther on obtient une poudre rouge cristalline.

Le produit brut est recristallisé dans un mélange d'alcool éthylique absolu et d'eau.

La méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 se présente sous forme de cristaux allongés de couleur rouge clair et dont le point de fusion est de 122°C.

Le rendement de cette préparation est de l'ordre de 40 pour cent.

# TROISIEME PARTIE

# ETUDE TOXICOLOGIQUE

Avant toute étude pharmacodynamique, il est de règle de procéder à une étude toxicologique. Celle-ci présente l'avantage de situer approximativement les limites supérieures de la zone d'activité pharmacodynamique.

Le but de notre travail étant purement théorique, nous nous sommes limités à la recherche de la toxicité aiguë sur une seule espèce animale.

x x

x

Pour exprimer la toxicité aiguë des substances étudiées, nous avons choisi la notation aujourd'hui classique : DL 50.
La DL 50 ou dose léthale 50, est la quantité de substance qui provoque la mort de 50 pour cent des animaux mis en expérience.

La méthode utilisée est dérivée de la technique décrite par MILLER et TAINTER (77).

# CHAPITRE I

# PRINCIPE

## 1-1 DETERMINATION DE LA DL 50

Pour réduire le nombre de points nécessaires à la construction du graphique représentant le rapport toxicité/dose, il est commode, par une opération mathématique, de transformer la courbe bien connue établie par TREVAN (81) en droite.
Ce résultat s'obtient en remplaçant :

1°) Les doses par leurs logarithmes .

2°) Les pourcentages de mortalité par les valeurs des probits correspondants fournies par des tables (84).

Par l'ordonnée correspondant au probit 5 (50%), on trace une parallèle à l'axe des abscisses et par le point d'intersection avec la droite, on abaisse la perpendiculaire à l'axe des abscisses, axe sur lequel on note la valeur du logarithme de la DL 50.

Cependant, les différentes valeurs des probits expérimentaux sont des valeurs aléatoires caractérisées pour une dose donnée par une certaine dispersion. Il est nécéssaire, pour obtenir une droite dans des conditions de plus grande précision d'en calculer les paramètres par la méthode des

moindres carrés ( droite de régression )

$$Y - \bar{Y} = a\,(X - \bar{X})$$

$$\bar{X} = \frac{\sum xi}{n} \qquad \bar{Y} = \frac{\sum yi}{n}$$

$$a = - \frac{\sum xiyi - n\bar{X}\bar{Y}}{\sum xi^2 - n\bar{X}^2}$$

## 1-2 DETERMINATION DE L'ECART TYPE

Pour l'estimation de l'écart type de la DL 50, on calcule les doses correspondant respectivement à 16 pour cent et 84 pour cent de mortalité ( probits 4 et 6 ); en soustrayant le premier du second, on obtient la valeur 2s qui est l'accroissement de dose nécessaire pour accroître de deux probits la réponse ( 82).
L'écart type approché est donné par :

$$E = \frac{2s}{\sqrt{2N'}}$$

N' étant le nombre total d'animaux dans les groupes qui ont donné des pourcentages de mortalité compris entre 6,7 et 93,3 pour cent ( soit, en probits : 3,50 et 6,50 ).

# CHAPITRE II

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nos déterminations ont été réalisées sur des souris E.O.P.S*, mâles, d'un poids moyen de 18 - 20 grammes. Pour chacun de nos essais, nous avons opéré sur des animaux à jeun depuis la veille.

Pour chaque produit nous utilisons quatre lots de souris. Ces lots sont plus importants au voisinage de la DL 50.
A chacun d'eux, nous administrons par sonde oesophagienne des quantités croissantes de produit ( en progression géométrique de raison de 1,1 à 1,4 ) en opérant de telle sorte que la quantité utile de produit soit contenue dans 0,5 millilitre d'huile d'arachide. Pour chaque dose, le pourcentage de mortalité est noté au bout de 24 heures et de 72 heures. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux suivants:

* Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques; dénomination correspondante : S.P.F ( Specific Pathogen Free ). IFFA CARWORTH.

## 2-1 CHLORO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

| Dose mg/kg | Nombre d'animaux | Nombre de morts | | % de mortalité | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 H | 72 H | 24 H | 72 H |
| 300 | 6 | 0 | 0 | 4,2* | 4,2* |
| 420 | 15 | 3 | 6 | 20 | 40 |
| 600 | 22 | 9 | 13 | 40,9 | 59 |
| 840 | 12 | 10 | 12 | 83,3 | 97,9* |

## 2-2 BROMO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

| Dose mg/kg | Nombre d'animaux | Nombre de morts | | % de mortalité | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 H | 72 H | 24 H | 72 H |
| 420 | 7 | 0 | 1 | 3,57* | 14 |
| 600 | 11 | 2 | 4 | 18 | 36 |
| 840 | 15 | 8 | 10 | 53 | 66 |
| 1000 | 8 | 5 | 8 | 62,5 | 96,8* |

* Valeurs corrigées (82).

## 2-3 CHLORO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

| Dose mg/kg | Nombre d'animaux | Nombre de morts | | % de mortalité | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 H | 72 H | 24 H | 72 H |
| 500 | 14 | 5 | 5 | 35,7 | 35,7 |
| 600 | 8 | 4 | 4 | 50 | 50 |
| 700 | 14 | 9 | 9 | 64,3 | 64,3 |
| 840 | 8 | 7 | 7 | 87,5 | 87,5 |

## 2-4 BROMO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

| Dose | Nombre | Nombre de morts | | % de mortalité | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 24 H | 72 H | 24 H | 72 H |
| 570 | 8 | 2 | 2 | 25 | 25 |
| 630 | 16 | 6 | 6 | 37,5 | 37,5 |
| 700 | 15 | 10 | 10 | 66,6 | 66,6 |
| 840 | 5 | 4 | 4 | 80 | 80 |

## 2-5 METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

Par suite de la difficulté technique de synthétiser de grandes quantités de cette substance, nous n'avons pu en déterminer la toxicité.

x x

x

Nous donnons ici un exposé détaillé des calculs pour un seul exemple : celui de la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4.
Pour les autres déterminations,nous nous bornerons à en fournir les résultats.

| Dose mg/kg | log.des doses x | N$^{bre}$ de souris | % de morts | Probits y | $x^2$ | xy |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 570 | 2,758 | 8 | 25 | 4,325 | 7,606 | 11,928 |
| 630 | 2,799 | 16 | 37,5 | 4,681 | 7,834 | 13,102 |
| 700 | 2,845 | 15 | 66,6 | 5,429 | 8,094 | 15,445 |
| 840 | 2,924 | 5 | 80 | 5,841 | 8,549 | 17,079 |

Détermination du point moyen :

$$\bar{X} = \frac{11,326}{4} = 2,831$$

$$\bar{Y} = \frac{20,276}{4} = 5,069$$

Nous appliquons alors la formule :

$$x_{DL50} = \bar{X} + \frac{5-\bar{Y}}{a}$$

Il nous suffit de déterminer " a " :

$$a = \frac{\sum(xy)-\bar{X}\sum(y)}{\sum(x^2)-\bar{X}\sum(x)} = \frac{57,554 - (2,831)\ (20,276)}{32,083 - (2,831)\ (11,326)} = 7,65$$

D'où l'on a :

$$x_{DL50} = 2,831 + \frac{5-5,069}{7,65} = 2,822$$

$$DL50 = 665\ mg/kg$$

L'équation de la droite de régression s'écrit :

$$y = 7,65\ x - b$$

$$b = \bar{Y} - 7{,}65\ \bar{X} = 5{,}069 - (7{,}65)(2{,}831) = -16{,}588$$

$$y = 7{,}65\ x - 16{,}588$$

Pour $y = 4$ , $x = 2{,}691$ soit 490 mg/kg

Pour $y = 6$ , $x = 2{,}952$ soit 900 mg/kg

$$2s = 900-490 = 410$$

$$N' = 8 + 16 + 15 + 5 = 44$$

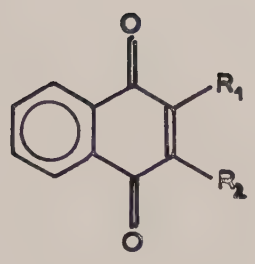
$$E = \frac{410}{\sqrt{2 \times 44}} = 43{,}7$$

$$DL50 = 665 \pm 43{,}7 \text{ mg/kg}$$

x x

x

Les résultats que nous avons obtenus pour les quatre anti-vitamines K sont consignés dans le tableau ci-après :




| SUBSTANCE | | DL50 (mg/kg) | |
|---|---|---|---|
| $R_1$ | $R_2$ | 24 H | 72 H |
| Cl | $NH_2$ | 605 ± 51,0 | 500 ± 36,0 |
| Br | $NH_2$ | 850 ± 50,6 | 640 ± 47,4 |
| Cl | OH | 580 ± 47,9 | 580 ± 47,9 |
| Br | OH | 665 ± 43,7 | 665 ± 43,7 |

Commentaire :

Les DL50 des quatre dérivés naphtoquinoniques étudiés étant très voisines,aux erreurs d'expériences près, nous avons estimé pouvoir mettre en oeuvre, lors de l'étude pharmacodynamique, les mêmes doses par kilogramme de poids vif .

# QUATRIEME PARTIE

# ETUDE PHARMACOLOGIQUE

# CHAPITRE I

## CHOIX DES TESTS

Pour étudier l'action des anti-vitamines K, la technique idéale serait celle qui indiquerait non seulement une activité résultante moyenne des facteurs déprimés, mais le taux du facteur qui se trouve le plus diminué.

Un tel test, à la fois complet et de réalisation facile, restant encore à trouver, il nous a fallu faire un choix parmi ceux dont dispose aujourd'hui le biologiste pour faire une étude analytique des réactions enzymatiques provoquant la coagulation.

Notre objectif était double :

1°) Connaître l'effet du traitement sur les facteurs vitamino K dépendants.

2°) Déterminer, si possible, le retentissement sur la coagulabilité globale .

Les premiers renseignements sont fournis par les tests suivants : Temps de QUICK - thrombo-test d'OWREN- "P" et "P" test - "K" test.

Les seconds sont apportés par le temps de recalcification plasmatique - le test de tolérance à l'héparine la thromboélastographie etc...

Comme test du premier groupe, nous avons donné la préférence malgré la mise au point d'épreuves plus récentes, à une technique éprouvée : le temps de QUICK.

Ce test explore le complexe prothrombinique dans son ensemble ( v.p. 34 ) dont trois facteurs (II-VII-X) seulement sur quatre sont déprimés par les anti-vitamines K. Aussi pourrait-on lui <<reprocher>> de tenir compte du taux d'accélérine (V) donc de ne pas refléter exclusivement les variations des facteurs sensibles aux anti-vitamines K, et, en outre de laisser inexploré le facteur prothromboplastique B, autrement dit, de ne pas être en mesure de traduire fidèlement l'effet global de la thérapeutique anticoagulante. Quelle importance faut-il attacher à ces inconvénients ?

- Certes, le temps de QUICK est influencé par l'accélérine, mais, en fait, l'éventualité d'une sous-évaluation du taux des facteurs sensibles aux anti-vitamines K par un défaut d'accélérine est exceptionelle et, par suite, cela ne constitue pas une raison suffisante pour écarter ce test car nous opérons pour chaque dose sur des lots de plusieurs animaux.

- Le facteur prothromboplastique B échappe à l'investigation ? le "P" et "P" test ( dosage du complexe prothrombine - convertine - facteur Stuart ) ne l'explore pas davantage; quant au thrombo-test d'OWREN, il ne l'explore que partiellement. D'une façon générale la diminution du facteur prothromboplastique B est parallèle au déficit du complexe prothrombinique. Une dissociation est cependant observée dans 15 pour cent des cas. Celle-ci, imputable à une sensibilité particulière du facteur B, mérite donc qu'on la prenne en considération.
On palie aisément cette lacune du test de QUICK en lui associant un test de coagulabilité globale.

Comme test de coagulabilité globale, nous avons préféré au temps de HOWELL ou au test de tolérance à l'héparine, la thromboélastographie , méthode moderne délicate nécessitant des précautions opératoires mais très sensible.

# CHAPITRE II

# DESCRIPTION DES TESTS CHOISIS

## *2-1 LE TEMPS DE QUICK*

### *2-1-1 PRINCIPE*

En ajoutant du calcium à un plasma décalcifié, on déclenche les réactions enzymatiques en chaîne qui se succèdent en trois étapes pour aboutir à la formation du caillot ( temps de HOWELL ).
Si au calcium on associe un excès de thromboplastine tissulaire, on supplée à la première étape ( formation de thromboplastine ) et on mesure d'emblée l'activité des réactions enzymatiques des deux dernières.

En conséquence, le temps de QUICK explore :

- Les facteurs du complexe prothrombinique ( prothrombine, accélérine, convertine, et stuart ) qui conditionnent la formation de la thrombine.

- Le substrat de cet enzyme : le fibrinogène.

Comme on peut le constater, l'appellation " taux de prothrombine " que l'on donne parfois à ce test est trop limitative et partiellement erronée.

Mais dans la mesure où la fibrinoformation est normale ( taux de fibrinogène normal ce qu'objectivera la thromboélastographie ou un dosage de cet enzyme ) et en l'absence d'antithrombines, le test de QUICK permet d'évaluer les activités groupées des facteurs du complexe prothrombinique.

*2-1-2 APPAREILLAGE*

Cette épreuve repose sur la mesure à 37° de temps de coagulation très courts( de l'ordre de huit secondes chez le lapin et de dix neuf secondes chez le rat ) dont les variations pathologiques sont relativement faibles. Il importe donc de saisir le moment précis où se forme le caillot, sans sortir le tube du bain-marie.

Pour ces raisons, nous avons utilisé un dispositif à agitation magnétique (70). Cet appareil (1) nous permettait de résoudre les difficultés majeures de cette technique en supprimant 90 pour cent du facteur personnel de l'expérimentateur, en réduisant au minimum les manipulations et en facilitant la lecture des résultats.

*2-1-3 MISE EN OEUVRE DU TEST*

La thromboplastine calcique (2) qui se présente sous forme lyophilisée est régénérée par quatre millilitres d'eau distillée et mise à incuber pendant dix minutes au bain-marie réglé à 37°C.

(1) " Bain-marie électromagnétique " type Paris-Labo ( Modèle R 84 )

(2) Nous avons utilisé pour nos déterminations la Simplastine WARNER - CHILCOTT.

On introduit 0,1 millilitre du plasma à tester dans un tube à hémolyse disposé sur le portoir du bain-marie.
Un petit barreau aimanté est placé dans le tube après avoir branché le mécanisme électro-magnétique.
On ajoute alors rapidement, en déclenchant le chronomètre, 0,20 millilitre de la solution de thromboplastine calcique.

Le mouvement rotatoire du barreau aimanté assure un parfait mélange des composants.
Lorsqu'il s'immobilise, à cause du changement d'état du milieu, on arrête le chronomètre : le temps "T" mesuré est le temps de QUICK du plasma examiné.
On le confirme par une deuxième mesure.

Remarque :

L'agitation électro-magnétique étant la même dans chaque expérience, on mesure toujours le temps correspondant à l'édification d'une qualité et d'une quantité déterminée de fibrine, ce qui est difficilement appréciable sans cet artifice.

### *2-1-4 EXPRESSION DES RESULTATS*

#### *2-1-4-1 Chez le lapin*

Nous avons converti les temps de QUICK en taux d'activité prothrombinique.
Classiquement, les courbes de conversion de QUICK sont des hyperboles établies en mesurant le temps de QUICK T d'un plasma normal dont, par convention, l'activité est de 100 pour cent - et de ses dilutions - dont l'activité est P pour cent ( $P = \frac{100}{D}$ ) .

Le tableau ci-après résume le schéma opératoire adopté pour tracer l'hyperbole de QUICK.

| dilution $\frac{1}{D}$ | temps de QUICK T | activité témoin P% |
|---|---|---|
| 1 | $T_1$ | 100 |
| $\frac{1}{2}$ | $T_2$ | 50 |
| $\frac{1}{4}$ | $T_4$ | 25 |
| $\frac{1}{5}$ | $T_5$ | 20 |
| $\frac{1}{10}$ | $T_{10}$ | 10 |

En portant en ordonnée les temps de QUICK T et en abscisse les valeurs P correspondantes, on construit la courbe du lot de thromboplastine, dont l'équation est :

$$P = \frac{a}{T-b} \times 100 \quad (1)$$

" a " et " b " sont deux paramètres fonctions de l'activité du réactif thromboplastique au moment de l'emploi.
Théoriquement ils sont constants pour un même lot de poudre thromboplastique mais peuvent varier d'un lot à l'autre.

Il est donc prudent de déterminer les paramètres " a " et " b ", une variation de ceux-ci pouvant avoir des répercussions importantes sur les résultats surtout chez le lapin où l'on mesure des temps inférieurs à ceux observés en clinique humaine.

Pour nos calculs, nous avons donc utilisé la méthode de la droite de Thivolle (69).
On remarque en effet que la relation (1) est logiquement équivalente à :

$$T = a \frac{100}{P} + b$$

soit :

$$T = a\,D + b \qquad (2)$$

Pour déterminer graphiquement " a " et " b " il suffit donc de porter T en fonction de la variable D.

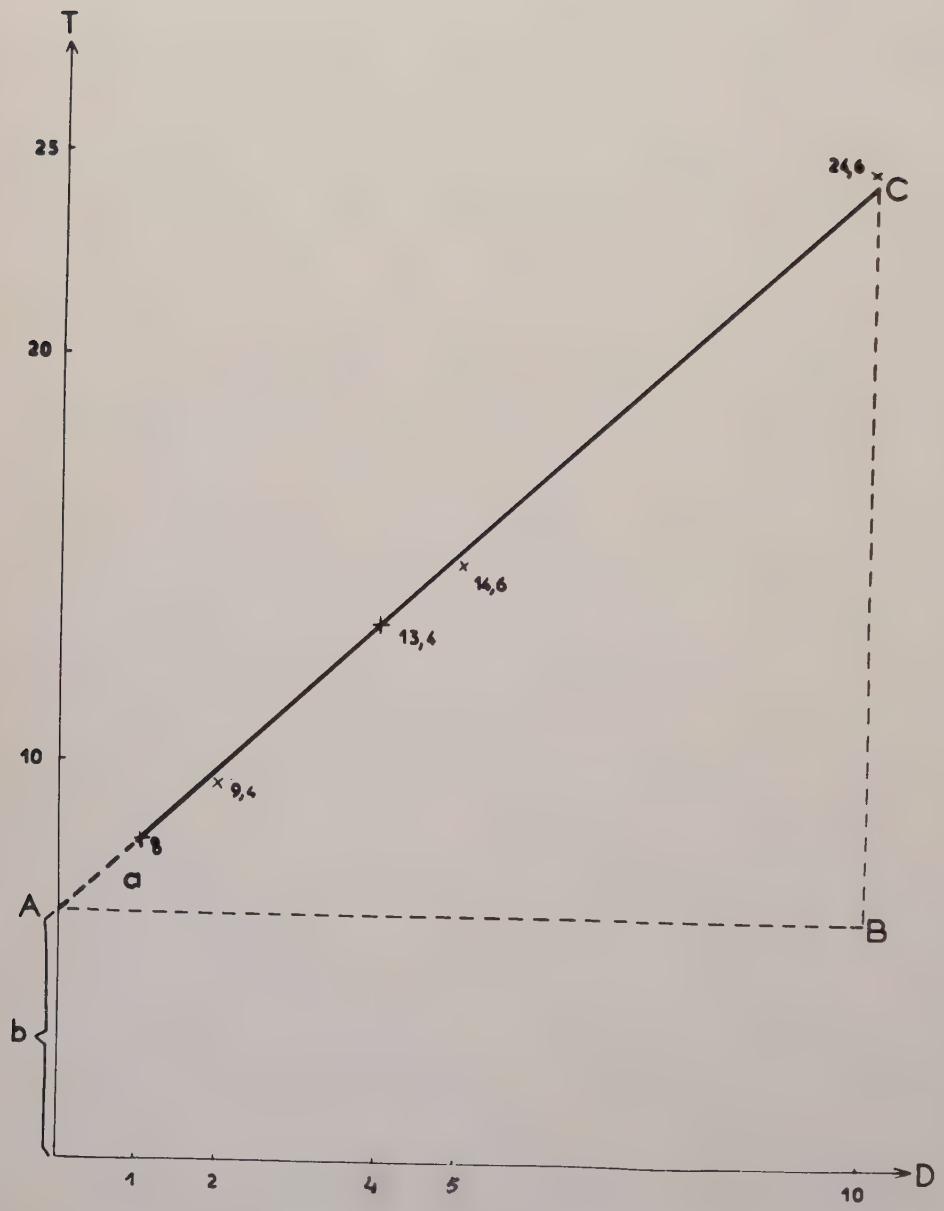



*Fig.1:droite de Thivolle*

La droite de Thivolle présente sur l'hyperbole de QUICK l'avantage de pouvoir être tracée facilement avec beaucoup plus d'exactitude à partir d'un nombre limité de résultats expérimentaux.

Exemple : ( voir figure 1 )

Les déterminations réalisées à partir d'un plasma normal de lapin ont fourni les résultats suivants :

| D | T (sec) |
|---|---|
| 1 | 8 |
| 2 | 9 4/10 |
| 4 | 13 4/10 |
| 5 | 14 6/10 |
| 10 | 24 6/10 |

Ces chiffres reportés sur le graphique nous permettaient de tracer la droite de Thivolle.

On trouvait :

$$b = 6,2$$

$$a = \frac{BC}{AB} = \frac{24,2 - 6,2}{10} = 1,8$$

Il n'est pas nécessaire par la suite de construire chaque fois une droite de Thivolle comme nous venons de le voir : il suffit de vérifier que les paramètres " a " et " b " n'ont pas subi d'importantes variations et, si c'est le cas,d'effectuer les mesures en fonction de leur valeur " du jour ".

Pour cela on détermine la moyenne des temps de QUICK de deux plasmas normaux et celle de leur dilution au quart et on applique la relation (2).

Ayant ainsi étalonné la thromboplastine, on calcule en pourcentage de la normale, l'activité prothrombinique des plasmas à éprouver grâce à la relation (1).

Exemple : ( lapin n° 45 )

- Plasmas normaux purs — moyenne 8 sec
- plasmas normaux dilués au quart — moyenne 13 sec 4/10
- Plasma du lapin n° 45 — 12 sec 2/10

$a + b = 8$ $\qquad$ $4a + b = 13,4$

$3a = 5,4$

$a = 1,8$

$b = 6,2$

activité prothrombinique du plasma du lapin n° 45 :

$$P = \frac{180}{12,2 - 6,2} = 30 \text{ pour cent}$$

*2-1-4-2 Chez le rat*

La construction de la droite de Thivolle, comme celle de l'hyperbole de QUICK, est impossible dans ce cas. En effet, l'expérience nous a montré qu'en réalisant une dilution du plasma au demi par exemple, on obtenait des temps de QUICK inférieurs à ceux du plasma pur.

On peut apporter une explication à ce fait paradoxal : chez le rat, les inhibiteurs de la coagulation sont beaucoup plus sensibles à la dilution que les activateurs : l'équilibre entre ces facteurs étant rompu, les activateurs exercent leur rôle au maximum.

Nous avons donc exprimé nos résultats en temps de QUICK .

## 2-2 LA THROMBOELASTOGRAPHIE

### 2-2-1 PRINCIPE

Introduite en 1948 par HARTERT ( 31,32,33 ), la thromboélastographie est une méthode fondée sur un principe physique original et permettant un enregistrement automatique sur un document photographique de la formation du caillot et de ses qualités en fonction du temps.

Ce test a donc sur le précédent la particularité, entre autres, d'explorer la thromboplastinoformation. Les deux autres temps de la coagulation plasmatique ( thrombino et fibrino-formation ) dépendent d'une thromboplastine naturelle néoformée apparaissant progressivement au sein du mélange et toujours en quantité réduite par rapport à l'excès de thromboplastine tissulaire apportée dans le temps de QUICK.

### 2-2-2 APPAREILLAGE

L'appareillage ou thromboélastographe* est formé de deux parties : l'une destinée à la mesure de la coagulation, l'autre à l'enregistrement du phénomène ( voir fig. 2 )

- Dispositif de mesure de la coagulation

Il est constitué essentiellement d'une cuve cylindrique en acier spécial non mouillable (1) destinée à recevoir le plasma (2) et dans laquelle plonge un cylindre

* HELLIGE

de même métal (3) dont la surface latérale et la base se trouvent à une même distance du fond et des parois internes de la cuve. Le cylindre qui peut être remonté ou descendu dans la cuve à volonté, est suspendu à un fil de torsion en acier (4). Ce fil est porteur d'un miroir (5) qui réfléchit un rayon lumineux (6) sur une échelle transparente (7) destinée à l'observation directe.

La cuve est encastrée dans une platine mobile (8) maintenue à 37°. Elle est animée dans le plan horizontal d'un mouvement oscillatoire périodique non pendulaire dont l'amplitude est de 4°45' et la période de 9 secondes y compris un temps d'arrêt d'une seconde à chaque extrêmité de son mouvement.

L'appareil possède trois de ces dispositifs côte à côte permettant en particulier d'exécuter simultanément un examen sur le plasma natif et un autre sur le plasma privé de ses plaquettes.

- Système d'enregistrement photographique.

Grâce à un système optique particulier, un second rayon réfléchi (9) pénètre dans la chambre à enregistrement et impressionne un papier sensible (10) qui se déroule d'un mouvement uniforme perpendiculairement au balayage du rayon lumineux à la vitesse de deux millimètres par minute.

### *2-2-3 MISE EN OEUVRE DU TEST*

Considérons une mesure sur le plasma obtenu à partir d'un sang décalcifié.

1° Le cylindre étant en position " haute ", on introduit dans la cuve 0,25 millilitre de plasma.

2° A la cinquante cinquième seconde on recalcifie avec 0,10 millilitre d'une solution de chlorure de calcium à 1,29 pour cent, à l'aide d'une seringue spéciale ( type seringue à insuline ) munie d'une aiguille recourbée sans biseau.
L'instant de l'adjonction du chlorure de calcium correspond

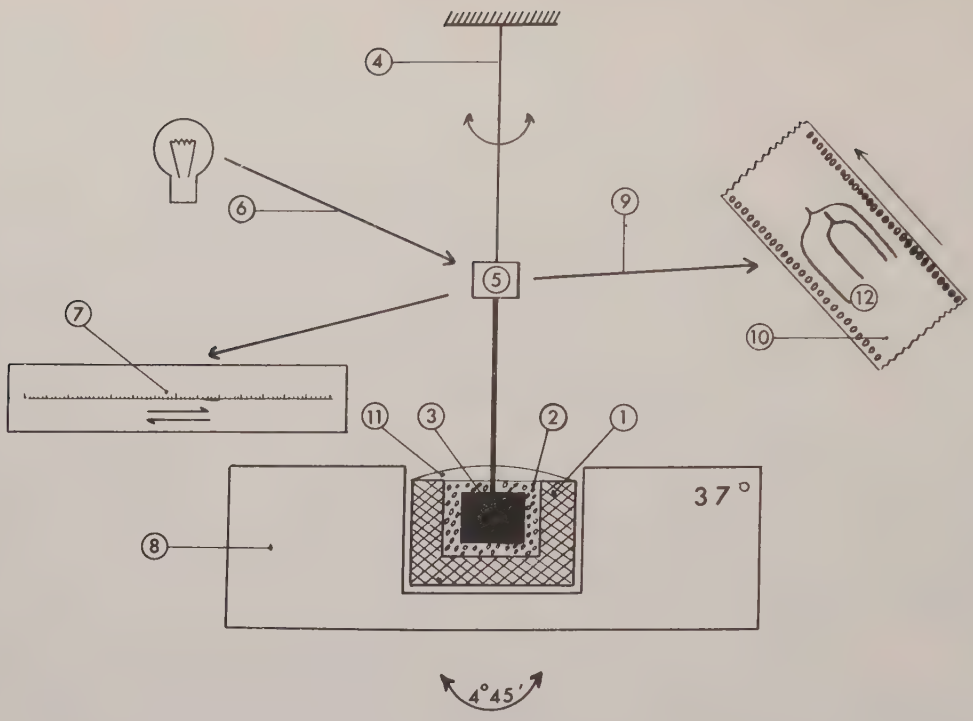



*Fig.2: schéma d'un thromboélastographe*

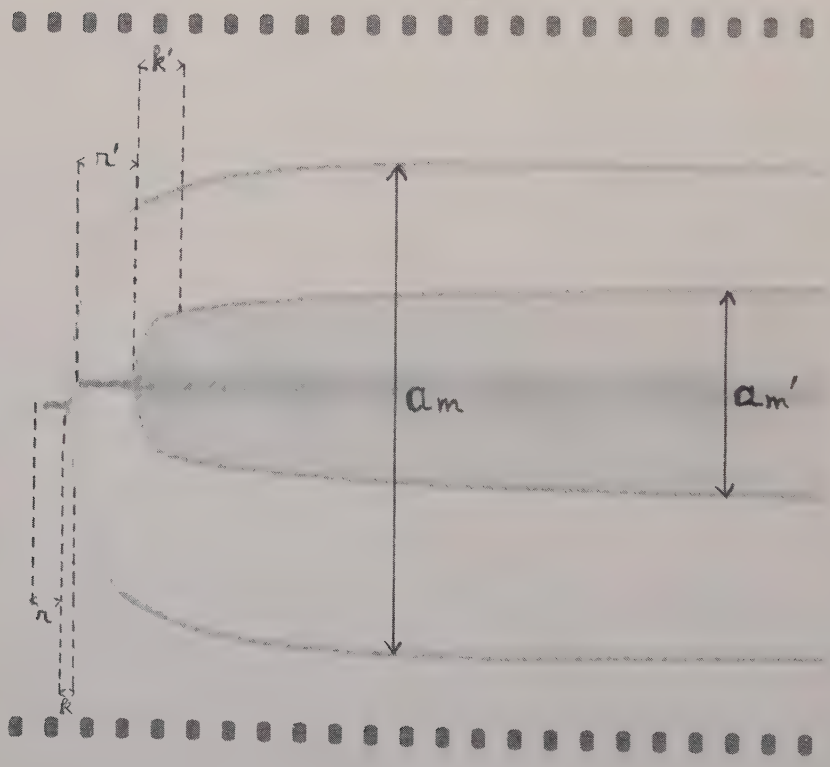



*Fig.2: thromboélastogramme de rat témoin*

au temps zéro réel, mais par convention on ne déclanchera l'enregistrement que trente cinq secondes après. Pendant ce laps de temps:

- Par plusieurs mouvements de descente et remontée du cylindre on assure l'homogénéisation du mélange plasma-chlorure de calcium.
- Le cylindre étant en position " basse ", on recouvre le plasma d'une couche d'huile de paraffine (11) pour éviter toute dessication ultérieure par chauffage.

3° Au temps une minute trente secondes, on abaisse le levier de commande du spot.
A partir de ce moment l'opération est automatique et contrôlable.

Au début, le milieu coagulable reste fluide et le cylindre n'est pas influencé par les mouvements d'oscillation périodique de la cuve : le spot lumineux demeure immobile et le rayon lumineux enregistreur trace une droite sur le papier photographique puisque celui-ci se déplace.

Dès que la fibrinoformation débute, la fibrine s'élabore en prenant appui sur les parois du cylindre et de la cuve; les mouvements de celle-ci se transmettent alors au cylindre avec une force croissante augmentant parallèlement à l'évolution des structures et à la qualité du caillot. L'inertie du fil de torsion qui au début s'oppose aux forces spécifiques mises en jeu est rapidement vaincue; le miroir tourne sur son axe d'un angle qui croît progressivement produisant un déplacement alternatif du spot sur l'échelle transparente et un balayage sinusoïdal du papier sensible par le rayon lumineux, avec un arrêt d'une seconde à chaque extrêmité de l'amplitude.

Ainsi la droite initiale tracée par le rayon lumineux se dédouble en deux branches symétriques qui sont le lieu géométrique des extrêmités de chaque déplacement du spot dont l'amplitude croît, passe par un maximum et décroît au cours de l'évolution dynamique du caillot. De sorte que le thromboélastogramme, après développement, apparaît comme

| | CONSTANTES LONGITUDINALES<br>Constantes chronométriques : 2 millimètres=1 minute | | | CONSTANTES TRANSVERSALES<br>Constantes millimétriques |
|---|---|---|---|---|
| *plasma natif* | r | k | r+k | $a_m$ |
| *plasma déplaquetté* | r' | k' | r'+k' | $a_{m'}$ |
| *commence*<br>*finit* | temps zéro réel<br>écartement des deux branches=1 mm | fin de r (ou r')<br>écartement des deux branches=20 mm | temps zéro réel<br>écartement des deux branches=1 mm | écartement maximum des deux branches courbes |
| *représente* | temps de latence de formation des premières trames de fibrine | activité enzymatique de la thrombine formée | durée totale visible de la coagulation | qualité dynamique du caillot |
| *correspond* | Thromboplastinoformation<br>+<br>thrombinoformation | "fibrinoformation" | temps de recalcification du plasma | activité :<br>- plaquettes + fibrinogène ($a_m$)<br>- fibrinogène ($a_{m'}$) |
| *variations* | augmentées dans les déficits en facteurs vitamino K - dépendants. | | | diminuées dans les hypofibrinogénémies |

*Tableau IX*
*définition et signification schématiques des constantes thromboélastographiques.*

un diagramme en forme de " diapason " (12) dont nous allons à présent envisager l'étude.

### *2-2-4 ETUDE DU THROMBOELASTOGRAMME*

Sur un thromboélastogramme physiologique ( nous prendrons celui du rat comme exemple : fig. 2 ) on définit plusieurs constantes chiffrables, correspondant plus particulièrement à l'étude d'un stade de la coagulation.

Nous avons présenté schématiquement dans le tableau IX la définition et la signification des constantes qui ont un intérêt pour notre expérimentation.

### *2-2-5 VALEURS NORMALES CHEZ LE RAT ET LE LAPIN*

Les valeurs normales que nous avons attribuées aux différentes constantes sont valables pour les prélèvements effectués sur citrate de sodium à 3,8 pour cent dans les proportions de : une partie de citrate pour quatre parties de sang, la recalcification étant faite dans les proportions de 0,10 millilitre de chlorure de calcium à 1,29 gramme pour cent pour 0,25 millilitre de plasma.

#### *2-2-5-1 Chez le rat*

Les moyennes obtenues à partir de notre expérimentation ( v.p. 105 ) ont donné les chiffres suivants :

| | |
|---|---|
| r = 2 min 21 sec | r' = 4 min 1 sec |
| k = 0 min 27 sec | k' = 3 min 10 sec |
| r+k = 2 min 48 sec | r'+k' = 7 min 20 sec |
| am. = 70 mm | am' = 32 mm |

2-2-5-2 Chez le lapin

Le manque de reproductibilité des tracés thromboélastographiques obtenus à partir des lapins témoins eux-mêmes nous a conduit à écarter ce test de notre expérimentation. Les constantes longitudinales sont en effet plus ou moins allongées, évoquant une héparinémie.

Ces variations ne peuvent en aucun cas provenir d'un mauvais prélèvement sanguin. Nous réalisons ce dernier en introduisant directement une tubulure en polyéthylène dans une carotide du lapin non anesthésié. Une anesthésie intra-veineuse à l'uréthane aurait en effet entrainé une dilution importante du sang.
Par contre, il est possible que le choc opératoire créé soit à l'origine d'une décharge d'anticoagulants circulants du type héparine. Cette hypothèse demanderait à être confirmée en étudiant l'action du sulfate de protamine sur un temps de thrombine.

# CHAPITRE III

# NOS CONDITIONS DE TRAVAIL

Pour obtenir des résultats interprétables et reproductibles, il est nécessaire en matière de coagulation de s'entourer de précautions (70).
Nous tenons donc, au risque de paraître par trop méticuleux, à insister sur nos conditions de travail.

## *3-1 LA PRISE DE SANG*

Effectuée sur l'animal, elle constitue sans aucun doute la principale cause d'erreur et nécessite de ce fait un soin tout particulier. Il convient en effet d'éviter à tout prix une contamination du sang par les extraits tissulaires, surtout dans le cas d'une exploration de la coagulabilité globale ( v.p. 32 ).

Nos examens ont été pratiqués uniquement sur des échantillons de sang recueillis rapidement, en l'absence de bulles.
En outre, pour tous les examens thromboélastographiques nous avons commencé le prélèvement proprement dit seulement après avoir éliminé les premières gouttes de sang.

Précisons enfin que toutes les prises de sang ont été effectuées sur des animaux à jeun depuis vingt quatre heures au moins.

## *3-2 LE MATERIEL*

Une condition essentielle pour obtenir des résultats valables est l'emploi d'un matériel d'une propreté rigoureuse, exclusivement réservée à la coagulation. Nous avons veillé à ce que cette condition soit toujours remplie.

Des aiguilles à plateau de 10/10 droites, à biseau court, montées sur seringue de dix centimètres cubes, ont été utilisées pour prélever, par ponction cardiaque, le sang destiné aux déterminations des temps de QUICK chez le lapin. Le sang était recueilli dans des récipients jaugés, en verre.

Afin de réduire au maximum les phénomènes de " contact " qui jouent un rôle capital dans la thromboplastiformation ( v. p. 26 ) les échantillons sanguins destinés aux examens thromboélastographiques ont été prélevés de la façon suivante : une tubulure en polyéthylène à usage unique est introduite directement dans l'artère abdominale chez le rat, ou dans une carotide chez le lapin, et permet l'écoulement du sang dans un tube en plastique jaugé contenant un anticoagulant.

## *3-3 L'ANTICOAGULANT*

Nous avons donné la préférence au citrate trisodique parce qu'il a l'avantage de préserver les plaquettes et les facteurs labiles de la coagulation.

Le rapport des volumes entre la solution anticoagulante et le sang recueilli présente une grande importance. En effet, l'idéal serait de diluer le plasma au minimum ( voir 3-1-4-2 )et de recueillir le sang sur anticoagulant désséché. Mais dans ces conditions, il existe un risque de coagulation au moment du prélèvement ( lente dissolution du sel, diffusion imparfaite etc ...) car le sang de rat ou de lapin coagule très vite. De plus cela nécessite souvent une agitation importante qui n'est pas souhaitable .

C'est pourquoi :

- dans le cas de la détermination du temps de QUICK chez le lapin nous avons opté pour la solution de citrate trisodique à 9 pour cent à raison de 0,5 millitre pour 9,5 de sang; dans ces conditions, la désionisation du calcium est immédiate et la dilution du plasma négligeable.

- dans le cas des examens thromboélastographiques nous avons choisi le citrate trisodique à 3,8 pour cent ( présenté dans le commerce en ampoule scellées de un millilitre * ) dans un rapport de 1/5, respectant ainsi le protocole suivi en clinique humaine.

Précisons enfin que les déterminations des temps de QUICK chez le rat ont été effectuées sur l'échantillon réservé à la thromboélastographie, le trop faible volume de sang de ces animaux interdisant le prélèvement d'un autre échantillon.

*3-4 DELAI ENTRE LE PRELEVEMENT ET L'EXAMEN*

Tous les examens ont été exécutés dans un délai de trois heures. En effet après ce laps de temps, des modifications apparaissent et s'accentuent rapidement. La diminution du taux de l'accélérine étant proportionnelle à la température de conservation, à la surface de contact avec l'air et inversement proportionnelle au volume de plasma conservé, les échantillons de sang des animaux témoins et des animaux traités ont été prélevés en même temps, recueillis sous des volumes égaux et conservés dans les mêmes

* Laboratoires BIOSEDRA

conditions de température et dans des récipients identiques.

## 3-5 SEPARATION DES ELEMENTS FIGURES

Nous l'avons réalisée par centrifugation lente de façon à obtenir des plasmas assez riches en plaquettes intactes. Bien entendu, tous les échantillons de sang destinés à une même série de mesures et leurs témoins ont été centrifugés en même temps.
Dans le plasma ainsi obtenu, le taux des plaquettes augmentent au fur et à mesure que l'on se rapproche de la couche des éléments figurés : aussi, avons nous préféré décanter dans un second tube le plasma surnageant et mélanger ses différentes couches par agitation douce.

Les plasmas déplaquettés ont été obtenus par centrifugation rapide dans une centrifugeuse réfrigérée. Durant cette opération les plasmas riches en plaquettes étaient conservés à + 4° .

# CHAPITRE IV

# ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-VITAMINIQUE K

## *4-1 INTRODUCTION*

Pour tester l'activité anti-vitaminique K d'une substance, on étudie par des tests appropriés (v.p.66) les modifications de la coagulation sanguine qu'entraine son administration à un animal.

D'une manière générale, l'expérimentation anti-vitaminique K fait appel au lapin.
Nous nous sommes donc adressés à cet animal pour étudier l'activité de nos produits.

## *4-2 PROTOCOLE OPERATOIRE*

Nous avons constitué des lots de cinq lapins environ dont la nourriture a été standardisée par l'utilisation de granulés *.

Chaque lot comprenait :

- des lapins témoins
- des lapins traités

* granulés lapins entretien, Lafitte.

### *4-2-1 MODE D'ADMINISTRATION DES SUBSTANCES*

- le lapin, à jeun depuis la veille, reçoit la substance à étudier ( dissoute dans de l'huile d'arachide ) par sonde oesophagienne montée sur une seringue.
- la dose administrée est calculée en fonction du poids de l'animal.
- l'administration du produit se fait trois fois de suite, à vingt quatre heures d'intervalle.

### *4-2-2 PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE SANG*

Le sang des lapins traités et des lapins témoins ( à jeun depuis la veille ) est prélevé par ponction cardiaque vingt à vingt quatre heures après le dernier tubage gastrique. On le mélange immédiatement à un vingtième de son volume de citrate trisodique à 9 pour cent.

### *4-2-3 TESTS PRATIQUES*

Un temps de QUICK est déterminé. On le convertit en pourcentage d'activité prothrombinique ( v.p. 70 ). Des contrôles du taux de fibrinogène sont effectués ( v.p.69).

## *4-3 RESULTATS*

Nous donnerons, dans un premier temps, les résultats obtenus avec les dérivés aminés :

- Chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4
- Bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4

Puis, nous envisagerons ceux fournis par les dérivés hydroxylés :

- Chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4
- Bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4

Pour chacune de ces substances nous donnerons un tableau dans lequel seront consignés :

- la dose administrée *, exprimée en milligrammes par kilogramme.
- le numéro d'ordre des lapins traités ainsi que leur poids et leur sexe.
- le taux (%) de l'activité prothrombinique (P.T.) **
- la mortalité dans les deux jours qui suivent la ponction cardiaque ( P.C.).
- la moyenne des taux de l'activité prothrombinique .
- l'écart type calculé selon la formule (10):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x-m)^2}{n-1}}$$

Les résultats obtenus avec les quatre substances nous ont permis de tracer pour chacune d'elles une droite de régression ( v.p. 57 ).

* La méthode de QUICK étant peu sensible entre 100 et 70 pour cent, nous avons été conduits à opérer avec des doses croissantes, et ceci sur des lots de cinq lapins environ chaque fois.

** Les croix inscrites dans cette colonne signifient que le lapin est mort avant la prise de sang.

Afin de situer l'activité des produits expérimentés, nous avons effectué selon un protocole identique, une expérimentation avec une anti-vitamine K utilisée en thérapeutique : la pindione.

Les contrôles des taux de fibinogène effectués au cours de ces expérimentations (23), ont toujours donné des valeurs normales comprises entre 3,40 et 7 grammes par litre .

## 4-3-1 DERIVES AMINES

### 4-3-1-1 CHLORO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

| DOSE INGEREE mg/kg | LAPINS | | | TAUX % DE L'ACTIVITE P.T. | MORTALITE 2 j. après la P.C. | MOYENNE | ECART TYPE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° | POIDS en kg | SEXE | | | | |
| 50 | 1 | 2,6 | f. | 100 | | 100 | - |
| | 2 | 3,6 | f. | 100 | | | |
| | 3 | 2,8 | m. | 100 | | | |
| 100 | 4 | 2,5 | m. | 57 | | 78 | 13,5 |
| | 5 | 3 | f. | 90 | | | |
| | 6 | 3,2 | m. | 76 | | | |
| | 7 | 3,1 | f. | 79 | | | |
| | 8 | 2,4 | f. | 90 | | | |
| 150 | 9 | 2,1 | f. | 47 | | 53 | 7,5 |
| | 10 | 2 | m. | 54 | | | |
| | 1 | 2,8 | f. | 66 | | | |
| | 11 | 2,6 | m. | 55 | | | |
| | 12 | 2,1 | f. | 50 | | | |
| | 7 | 2,9 | f. | 45 | | | |
| 200 | 13 | 2,4 | m. | 50 | | 42 | 10,3 |
| | 14 | 2,3 | m. | 47 | | | |
| | 15 | 2,9 | m. | 47 | + | | |
| | 11 | 3,2 | m. | 62 | | | |
| | 6 | 2,6 | m. | 46 | | | |
| | 16 | 2,5 | m. | 40 | | | |
| 250 | 4 | 2,2 | m. | 33 | | 30 | 5,8 |
| | 9 | 2,2 | f. | 24 | + | | |
| | 17 | 2,5 | m. | 37 | + | | |
| | 18 | 2,6 | f. | 27 | + | | |
| | 3 | 2,8 | m. | + | | | |

## *4-3-1-2 BROMO-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4*

| DOSE INGEREE mg/kg | LAPINS | | | TAUX % DE L'ACTIVITE P.T. | MORTALITE 2 j. après la P.C. | MOYENNE | ECART TYPE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° | POIDS en kg | SEXE | | | | |
| 50 | 9 | 3,5 | f. | 100 | | 100 | - |
| | 19 | 2,7 | m. | 100 | | | |
| | 20 | 2,2 | m. | 100 | | | |
| 100 | 1 | 2,8 | f. | 73 | | 72 | 5,4 |
| | 12 | 2,2 | f. | 71 | | | |
| | 21 | 3,3 | f. | 71 | | | |
| | 22 | 2,8 | m. | 65 | | | |
| | 19 | 2,6 | m. | 80 | | | |
| 150 | 23 | 2,1 | f. | 40 | | 43 | 12,4 |
| | 24 | 2,4 | m. | 27 | + | | |
| | 6 | 3,2 | m. | 58 | | | |
| | 25 | 2,2 | m. | 32 | + | | |
| | 26 | 3,3 | f. | 57 | + | | |
| 200 | 10 | 2 | m. | + | | 27 | 6,1 |
| | 14 | 2 | m. | 20 | + | | |
| | 5 | 3,2 | f. | 32 | | | |
| | 27 | 2,9 | f. | 28 | + | | |
| | 19 | 2,5 | m. | + | | | |
| 250 | 13 | 2 | m. | + | | - | - |
| | 28 | 2,5 | f. | + | | | |
| | 20 | 3 | m. | + | | | |

## 4-3-2 DERIVES HYDROXYLES

### 4-3-2-1 CHLORO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

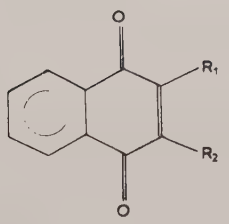
| DOSE INGEREE mg/kg | LAPINS | | | TAUX % DE L'ACTIVITE P.T. | MORTALITE 2 j. après la P.C. | MOYENNE | ECART TYPE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° | POIDS en kg | SEXE | | | | |
| 50 | 5 | 3,3 | f. | 100 | | 100 | - |
| | 29 | 3 | f. | 100 | | | |
| | 30 | 2,4 | m. | 100 | | | |
| 100 | 30 | 2,4 | m. | 57 | | 74 | 14,7 |
| | 31 | 3 | f. | 90 | | | |
| | 32 | 2,4 | f. | 60 | | | |
| | 33 | 3,6 | m. | 67 | | | |
| | 34 | 2,7 | m. | 80 | | | |
| | 35 | 2,5 | f. | 90 | | | |
| 150 | 2 | 3,6 | f. | 51 | | 64 | 11,1 |
| | 36 | 2,6 | m. | 80 | | | |
| | 29 | 2,9 | f. | 59 | | | |
| | 37 | 3 | f. | 69 | | | |
| | 38 | 2,6 | m. | 60 | | | |
| 200 | 39 | 2,4 | m. | 70 | | 59 | 9,6 |
| | 40 | 2,8 | m. | 52 | | | |
| | 41 | 2,7 | f. | 64 | | | |
| | 42 | 3,1 | m. | 50 | | | |
| | 43 | 2,4 | f. | + | | | |
| 250 | 44 | 2,8 | f. | 47 | | 42 | 8,7 |
| | 45 | 3 | f. | 30 | | | |
| | 46 | 2,7 | m. | 50 | | | |
| | 47 | 2,6 | f. | + | | | |
| | 48 | 2,3 | m. | + | | | |

## *4-3-2-2 BROMO-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4*

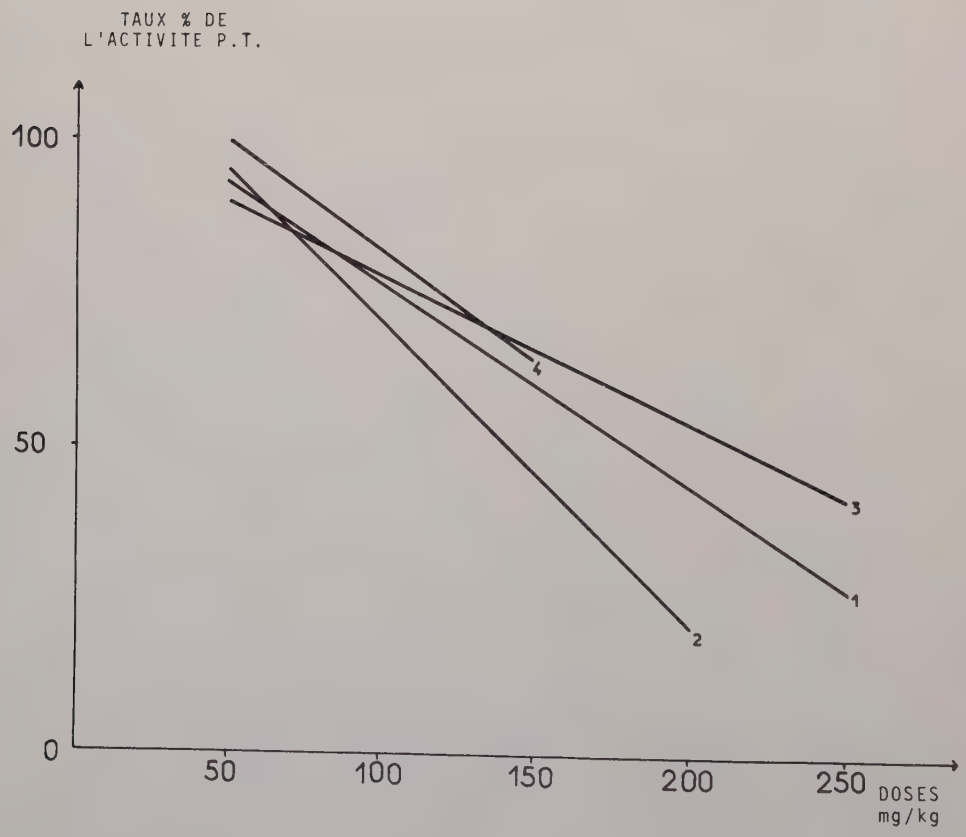
| DOSE INGEREE mg/kg | LAPINS | | | TAUX % DE L'ACTIVITE P.T. | MORTALITE 2 j. après la P.C. | MOYENNE | ECART TYPE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° | POIDS en kg | SEXE | | | | |
| 50 | 49 | 2,7 | m. | 100 | | 100 | - |
| | 50 | 2,5 | f. | 100 | | | |
| | 51 | 2,8 | m. | 100 | | | |
| 100 | 49 | 2,6 | m. | 80 | + | 85 | 10,5 |
| | 50 | 3,2 | f. | 100 | | | |
| | 51 | 2,4 | m. | + | | | |
| | 52 | 2,6 | f. | 85 | | | |
| | 53 | 2,6 | m. | 75 | | | |
| 150 | 54 | 3,1 | m. | 49 | + | 64 | 20,9 |
| | 51 | 2,6 | m. | + | | | |
| | 55 | 2,8 | f. | 90 | + | | |
| | 35 | 2,5 | m. | 60 | + | | |
| | 56 | 3 | f. | 80 | | | |
| | 57 | 2,8 | f. | 40 | + | | |
| | 50 | 2,6 | m. | + | | | |
| 200 | 58 | 2,5 | f. | + | | - | - |
| | 59 | 2,6 | m. | + | | | |
| | 60 | 2,8 | m. | + | | | |
| | 61 | 2,4 | f. | + | | | |
| 250 | 62 | 2,8 | m. | + | | - | - |
| | 63 | 3 | f. | + | | | |
| | 64 | 2,8 | f. | + | | | |

*Fig.3*

## DROITES DE REGRESSION




| N° | SUBSTANCE $R_1$ | SUBSTANCE $R_2$ | $\overline{X}$ | $\overline{Y}$ | a |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Cl | $NH_2$ | 156 | 59 | 0,33 |
| 2 | Br | $NH_2$ | 125 | 59 | 0,49 |
| 3 | Cl | OH | 145 | 68 | 0,24 |
| 4 | Br | OH | 108 | 80 | 0,36 |

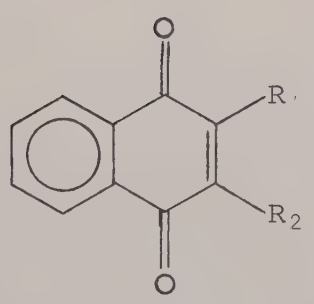


Commentaires

1 - La chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 , la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 et la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ont toutes trois, conformément aux hypothèses de GAULTIER et HAUW, une activité anti-vitaminique K.

2 - Cette activité apparaît seulement pour des doses supérieures à 50 mg/kg. Elle est particulièrement nette quand on atteint 150 et 200 mg/kg .

3 - Les droites de régression ( fig.3 ) permettent de comparer entre eux les quatre produits étudiés. Il est possible de déterminer à partir de ces droites la dose capable de diminuer de 50 pour cent le taux de l'activité prothrombinique du lapin. Le tableau ci-dessous donne pour chaque dérivé naphtoquinonique la valeur de cette " dose efficace 50 " ( DE50).




| SUBSTANCE | | DE50 |
|---|---|---|
| $R_1$ | $R_2$ | mg/kg |
| Cl | $NH_2$ | 180 |
| Br | $NH_2$ | 140 |
| Cl | OH | 215 |
| Br | OH | + |

Comparée à la chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 prise pour référence par GAULTIER et HAUW (58), l'activité anti-vitaminique K des dérivés

aminés est supérieure. Le dérivé bromé est le plus actif .
En ce qui concerne la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 , la dose de 150 mg/kg n'ayant pu être dépassée par suite de sa toxicité, il est plus difficile de se prononcer. Son activité semble cependant inférieure à celle des dérivés aminés.

4 - Contrairement à ce que pouvait laisser prévoir la détermination de la dose léthale 50 chez la souris ( v.p. 64 ) , les dérivés bromés se révèlent chez le lapin beaucoup plus toxiques que les dérivés chlorés.

*4-3-3 PINDIONE*

Cette expérimentation ayant uniquement pour but de situer l'activité des dérivés naphtoquinoniques étudiés, nous avons administré à cinq lapins une dose unique de pindione.

| DOSE INGEREE mg/kg | LAPINS | | | TAUX % DE L'ACTIVITE P.T. | MORTALITE 2 j. après la P.C. | MOYENNE | ECART TYPE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N° | POIDS en kg | SEXE | | | | |
| 10 | 64 | 3,2 | m. | 24 | | 22 | 5,8 |
| | 65 | 3,7 | f. | 16 | | | |
| | 66 | 3,3 | f. | 31 | | | |
| | 67 | 3,4 | m. | 20 | | | |
| | 68 | 2,8 | f. | 19 | | | |

Commentaire

Comparée à la pindione, l'activité anti-vitaminique K des dérivés naphtoquinoniques étudiés est faible puisque même avec le plus actif de ces composés ( bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ) elle n'atteint pas un vingtième.

# CHAPITRE V

## ETUDE DE L'ACTIVITE VITAMINIQUE K

## par une méthode personnelle

### *5-1 INTRODUCTION*

Les méthodes d'étude pharmacodynamique des vitamines K font appel à des animaux en état d'avitaminose K. Elles consistent en une exploration de la coagulation sanguine :

1° d'animaux témoins

2° d'animaux avitaminosés

3° d'animaux avitaminosés traités par les substances à tester.

Classiquement, les expérimentations sont conduites sur le jeune poulet soumis à un régime dénué de vitamine K (19).

Les protocoles opératoires cependant, sont nombreux et variables, chaque auteur proposant le sien. Les références bibliographiques suivantes témoignent de cette diversité ( 20,75,5,6,21,43,65,79,80,35 ).

Ces méthodes présentent en outre divers inconvénients :

- l'obtention d'animaux d'un âge identique

- l'emploi de couveuses spéciales
- la difficulté de se procurer des aliments dépourvus de vitamine K
- le faible volume de sang de ces animaux et la difculté de son prélèvement.

Ces raisons nous ont conduit à la mise au point d'une méthode simple utilisant un animal " classique " de laboratoire : le rat.

Une carence en vitamine K ne pouvait être obtenue, comme chez le poulet, à l'aide d'un régime dénué de cette vitamine . En effet, contrairement à cet animal, le rat est pourvu d'une portion intestinale très longue de sorte que l'importance de la synthèse endogène (vitamine $K_2$ ) supplée cette carence d'apport, d'autant plus qu'il existe une coprophagie naturelle chez ce rongeur.

Pour avitaminoser les rats, nous avons mis à profit l'observation faite par MOORE et WANG (60) et par LIGHT (46), selon laquelle des surdosages en vitamine A chez ces animaux étaient à l'origine de sévères hypoprothrombinémies curables par de faibles doses de vitamine K1 .

A notre connaissance aucune méthode de mise en évidence ou de dosage de l'activité vitaminique K n'avait été développée à partir de cette avitaminose expérimentale.

## 5-2 PROTOCOLE OPERATOIRE

Deux types de rats ont été utilisés pour notre expérimentation :

- des rats conventionnels
- des rats E.O.P.S ( v.p. 58 ) de souche C.F.E

La nourriture de ces animaux était constituée exclusivement de pain, afin de supprimer tout apport exogène de vitamine K.

Nous définirons dans un premier temps le protocole opératoire adopté pour créer un état d'avitaminose K chez le rat.
La correction de cette carence par des substances à activité vitaminique K fera l'objet d'une seconde partie .

## 5-2-1 OBTENTION DE LA CARENCE EN VITAMINE K

### 5-2-1-1 Choix d'une dose de vitamine A

Nous utilisons une dose de 20.000 unités de vitamine A par jour et par rat.
En effet, des doses plus faibles, de l'ordre de 10.000 unités, se montrent insuffisantes pour carencer le rat en vitamine K. Inversement, des doses massives ( 35.000 à 40.000 unités ), outre la perte de poids importante, peuvent entraîner la mort de l'animal par hémorragie cérébrale.

### 5-2-1-2 Préparation des solutions de vitamine A

Des solutions huileuses d'acétate de vitamine A* sont préparées. L'excipient utilisé est l'huile d'olive. Ces solutions, conservées dans un endroit frais, en flacon jaune, sont refaites fréquemment et titrent 40.000 unités par millilitre. Chaque rat reçoit donc 0,5 ml de cette solution par jour.

### 5-2-1-3 Mode d'administration

La vitamine A est administrée aux rats par sonde oesophagienne montée sur une seringue du type " seringue à insuline ".

* vitamine A acétate 2.800.000 ui/g F. HOFFMANN - LA ROCHE

### 5-2-1-4 Durée du traitement

Le traitement est poursuivi pendant douze jours entiers au cours desquels on note les variations de poids des animaux *.
Le douzième jours les rats sont mis à la diète hydrique.

### 5-2-1-5 Prélèvement des échantillons de sang

Vingt quatre heures après le dernier tubage ( treizième jour ) nous procédons au prélèvement sanguin comme suit :

- anesthésie générale mais légère et rapide à l'éther.
- laparotomie ,
- dégagement de l'aorte abdominale,
- clampage de celle-ci entre deux clamps vasculaires,
- petite incision de la paroi artérielle,
- cathétérisme au moyen d'une tubulure en polyé - thylène, et ligature
- levée du clamp supérieur après avoir fermé le cathéter à l'aide d'une pince de Kocher
- élimination du sang dans un tube hydrofugé jaugé à 5 ml et contenant un millilitre de citrate de sodium à 3,8 pour cent.
- agitation douce du tube par retournement, après l'avoir bouché à l'aide d'un bouchon hydrofugé.

* Les pertes de poids enregistrées au cours de notre expérimentation n'étant pas significatives, nous n'en ferons pas état par la suite.

### 5-2-1-6 Tests pratiqués

Sur le même échantillon de sang nous pratiquons un temps de QUICK et un examen thromboélastographique.

## 5-2-2 DETERMINATION DE L'ACTIVITE VITAMINIQUE K
## ( suppression de la carence )

On traite de nouveaux lots de rats de façon identique en associant quotidiennement à la vitamine A les substances à tester. La réapparition de tests normaux signera une activité vitaminique K.

La substance à étudier est mise en solution dans l'huile d'olive. Son administration se fait sous un volume de 0,5 ml, à une dose calculée en fonction du poids de l'animal.

Pour éviter toute souillure de la solution de vitamine A, un matériel de tubage est réservé pour chaque solution. L'administration des substances à tester se fait immédiatement après celle de la vitamine A.

x x
x

Afin de respecter les délais entre le prélévement sanguin et l'analyse ( v.p. 86 ), nous avons étalé notre expérimentation de façon à avoir un lot de quatre rats seulement le jour de l'analyse.
Chaque lot comportait un rat ayant reçu uniquement l'excipient, pendant douze jours ( rat témoin ).

## *5-3 RESULTATS*

Nous donnerons en premier lieu les résultats relatifs à la mise en évidence de la carence vitaminique K des rats.
Puis, nous envisagerons ceux fournis à la suite du traitement de ces animaux par les substances à tester.

### *5-3-1 MISE EN EVIDENCE DE LA CARENCE*

Les tableaux X, XI et XII rassemblent les résultats obtenus au cours de notre expérimentation :

- avec les rats traités par la vitamine A.
- avec les rats témoins correspondant à chaque expérience.

Tableau X

Il concerne les temps de QUICK.

Nous y avons fait figurer :

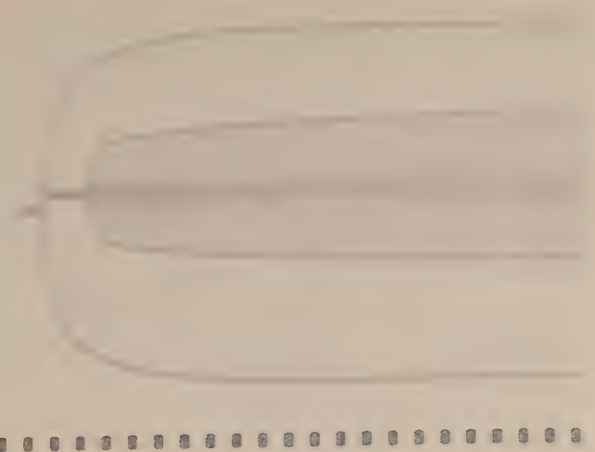
- le type de rats utilisés
- le numéro de l'expérience
- les temps de QUICK exprimés en secondes :
  - des plasmas des rats témoins
  - des plasmas des rats traités par la vitamine A.

Nous avons relevé au bas de ce tableau :

- le nombre d'expériences
- les moyennes $m_1$ et $m_2$ des temps de QUICK des rats témoins et des rats traités
- les écarts types s, correspondants .

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 1 | 19,0 | 26,0 |
| | 2 | 18,6 | 22,0 |
| | 4 | 18,0 | 28,0 |
| | 5 | 18,0 | 27,0 |
| | 6 | 21,0 | 49,0 |
| | 8 | 19,0 | 26,0 |
| | 10 | 15,2 | 26,2 |
| | 12 | 18,0 | 26,0 |
| | 13 | 19,0 | 23,4 |
| | 14 | 20,0 | 23,2 |
| | 14 | 20,0 | 35,0 |
| | 15 | 19,8 | 24,2 |
| RATS E.O.P.S. | 17 | 19,0 | 33,0 |
| | 18 | 18,6 | 47,0 |
| | 19 | 19,0 | 34,0 |
| | 22 | 18,4 | 48,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 16 | 16 |
| MOYENNE | | 19,0 | 31,1 |
| ECART TYPE | | 0,83 | 9,2 |
| TEST DE STUDENT | | t = 5,1 | |

*Temps de Quick(tableau X)*
*–des rats témoins*
*–des rats avitaminosés*



| N° DE L'EXPERIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_{m'}$ |
| 1 | 19,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 73 mm | 3'40" | 1'30" | 5'10" | 37 mm |
| 2 | 18,8 | 2'30" | 0'15" | 2'45" | 76 mm | 4'15" | 1'45" | 6' | 37 mm |
| 3 | 19,0 | 2'30" | 0'20" | 2'50" | 69 mm | 4'15" | 1'30" | 5'45" | 35 mm |
| 5 | 18,0 | 2'15" | 0'15" | 2'30" | 78 mm | 4'45" | 1'45" | 6'30" | 35 mm |
| 6 | 21,0 | 2'15" | 0'25" | 2'40" | 66,5 mm | 3'45" | 3'30" | 7'15" | 28 mm |
| 8 | 19,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 64 mm | 4'15" | 5'15" | 9'30" | 27 mm |
| 10 | 19,2 | 2'30" | 0'45" | 3'15" | 68 mm | 3'45" | 3'45" | 7'30" | 35 mm |
| 11 | 19,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 66 mm | 4'40" | 6' | 10'40" | 27 mm |
| 14 | 20,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 68,5 mm | 3'45" | 3'10" | 6'55" | 29 mm |
| 22 | 18,4 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 71 mm | 4'30" | 3'30" | 8' | 30 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| MOYENNE | | 2'21" | 0'27" | 2'48" | 70 mm | 4'10" | 3'10" | 7'20" | 32 mm |

*Thromboélastogrammes des rats témoins*
*–tracé type*
*–constantes(tableau XI)*

| N° DE L'EXPERIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_{m'}$ |
| 2 | 22,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 71,5 mm | 5'30" | 3'30" | 9' | 32 mm |
| 6 | 49,0 | 3'45" | 0'45" | 4'30" | 65 mm | 9'30" | 7' | 16'30" | 29 mm |
| 8 | 26,0 | 2' | 0'30" | 2'30" | 68 mm | 3'15" | 9'15" | 12'30" | 25 mm |
| 10 | 26,2 | 2'30" | 0'20" | 2'50" | 72 mm | 4' | 3'45" | 7'45" | 30 mm |
| 13 | 23,4 | 2'45" | 0'20" | 3'05" | 74 mm | 5'30" | 2'35" | 8'05" | 31 mm |
| 14 | 23,2 | 2'20" | 0'30" | 2'50" | 71 mm | 4'30" | 2'45" | 7'15" | 29 mm |
| 14 | 35,0 | 2'45" | 0'30" | 3'15" | 69 mm | 7'15" | 7' | 14'15" | 24 mm |
| 18 | 47,0 | 3'15" | 0'30" | 3'45" | 75 mm | 10' | 3'45" | 13'45" | 42 mm |
| 19 | 34,0 | 2'15" | 0'20" | 2'35" | 72,5 mm | 8'30" | 5'30" | 14' | 28 mm |
| 22 | 48,0 | 3'15" | 0'45" | 4' | 74 mm | 9'30" | 5'30" | 15' | 30 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| MOYENNE | | 2'44" | 0'30" | 3'14" | 71,3 mm | 6'45" | 5'03" | 11'48" | 30 mm |

*Thromboélastogrammes des rats avitaminosés*
*–tracé type*
*–constantes(tableau XII)*

- la valeur expérimentale t ( test de Student ), pour connaître la signification de la différence $m_1 - m_2$ ( 10 ).

$$t = \frac{(m_1 - m_2)}{s_D}$$

avec

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m_1)^2 + \sum (x_i - m_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Tableaux XI et XII

Ils correspondent aux constantes thromboélastographiques obtenues respectivement avec les plasmas :

- des rats témoins ( tableau XI )
- des rats traités par la vitamine A ( tableau XII )

Dans chacun de ces tableaux, on trouvera :

- le numéro de l'expérience
- le temps de QUICK
- les constantes des thromboélastogrammes correspondants,
  r, k, r + k et am pour le plasma natif
  r', k', r' + k' et am pour le plasma déplaquetté
- le nombre d'expériences
- les moyennes des constantes.

Avec chacun des tableaux, nous avons donné un exemple de tracé thromboélastographique correspondant sensiblement aux constantes moyennes calculées.

Commentaires

Tableau X

1° La différence entre les moyennes des temps de QUICK des rats témoins et de ceux des rats traités avec 20.000 unités de vitamine A est de 12,2 secondes. La valeur expérimentale t= 5,1 indique une probabilité pour que cette différence soit significative supérieure à 0,999, ce qui est remarquablement net dans le cas d'un test biologique.
Elle justifie donc pleinement la valeur de notre méthode.

On peut se demander quel est le mécanisme de cette carence par la vitamine A. Nous reviendrons sur ce point p.130.

2° La valeur relativement élevée de l'écart type calculé à partir des temps de QUICK obtenus avec les rats traités par la vitamine A témoigne cependant des différences de sensibilité des rats à ce traiment.
Dans tous les cas cependant les chiffres trouvés ont été supérieurs à ceux obtenus avec les rats témoins.

3° Les rats E.O.P.S fournissent les temps de QUICK les plus élevés.
Ceci apparaît nettement dans le tableau ci-après où nous avons consigné pour chaque type de rats utilisés :

- le nombre d'expériences
- la moyenne des temps de QUICK des rats traités et des rats témoins correspondants
- l'écart type.

- la valeur expérimentale de t ( test de STUDENT )

| TYPE DE RATS UTILISES | RATS CONVENTIONNELS | | RATS E.O.P.S | |
|---|---|---|---|---|
| NOMBRE D'EXPERIENCES | 12 | | 4 | |
| LOTS | témoins | traités | témoins | traités |
| MOYENNE DES TEMPS DE QUICK(secondes) | 19,13 | 28 | 18,75 | 40,5 |
| ECART TYPE | 0,93 | 7,4 | 0,3 | 8,1 |
| TEST DE STUDENT | t = 4,2 | | t = 5,3 | |

Tableaux XI et XII

1° On note une augmentation des constantes longitudinales sous l'effet de la vitaminothérapie A.

2° Cette augmentation est cependant faible. Elle devient importante seulement pour des temps de QUICK de l'ordre de 40 secondes et plus.
Ces résultats étaient prévisibles :
le thromboélastogramme est véritablement influencé par atteinte des facteurs sensibles aux vitamines K, seulement lorsque le facteur IX est déprimé. Or, lors d'une carence en vitamine K ou d'un traitement aux anti-vitamines K, la diminution du facteur IX à lieu tardivement par rapport à celle des autres facteurs(II, VII et X ).

3° Du fait de l'hyperplaquettose physiologique du rat, les plasmas déplaquettés fournissent des constantes longitudinales sensibilisées, capables de révéler une atteinte légère des facteurs vitamino-K dépendants alors que les constantes des plasmas natifs restent normales.

4° Les constantes transversales attestent toujours un fibrinogène normal chez tous les rats.

### *5-3-2 MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE VITAMINIQUE K*

Nous donnerons, dans un premier temps, les résultats obtenus avec le dérivé aminé à tester :

la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4.

Puis nous envisagerons ceux fournis par le dérivé hydroxylé correspondant dont l'activité vitaminique K est connue:

la méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ( phtiocol ).

Pour chacune de ces substances nous avons cherché la dose capable de suppléer à l'avitaminose K due au traitement par la vitamine A.
Pour cela, des doses croissantes de ces dérivés naphtoquinoniques ont été administrées aux rats en même temps que la vitamine A.

Au cours d'essais préliminaires, les doses de 50 et 100 microgrammes/kg se sont révélées insuffisantes ( temps de QUICK peu différents de ceux obtenus avec les plasmas des rats traités uniquement avec la vitamine A ).
Afin de ne pas surcharger les tableaux, seuls les résultats obtenus avec les doses de 250, 400 et 500 microgrammes/kg ont été retenues.
Pour chacune de ces doses, nous avons constitué des lots de six rats parmi lesquels se trouvaient des animaux appartenant aux deux espèces utilisées.

Les résultats obtenus pour chaque produit et pour chaque dose sont consignés dans deux tableaux analogues à ceux donnés pour les animaux témoins et les animaux traités par la vitamine A.

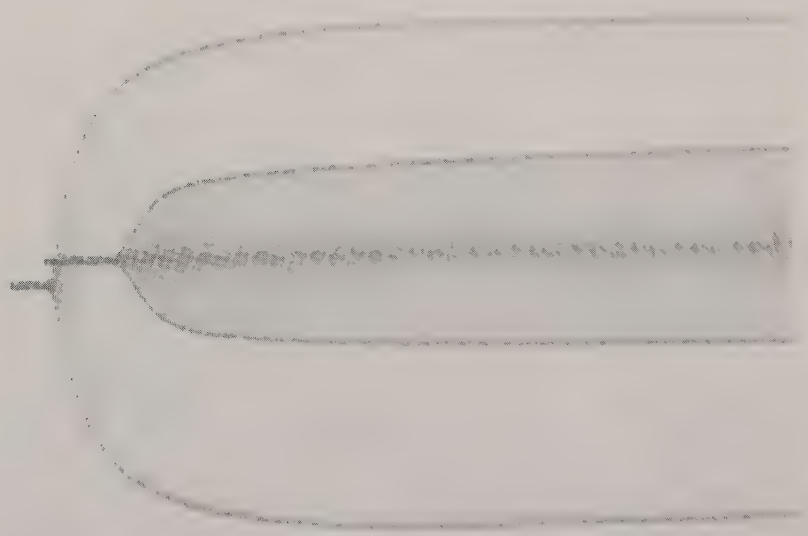
En ouvrant le dépliant de la page 106, on comparera aisément les différentes valeurs .

5-3-2-1 METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

*A LA DOSE*
*DE*
*250 MICROGRAMMES PAR KILOGRAMME*

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 6 | 21,0 | 24,0 |
| | 12 | 18,0 | 23,2 |
| | 13 | 19,0 | 25,0 |
| | 14 | 20,0 | 29,2 |
| RATS E.O.P.S. | 18 | 18,6 | 27,0 |
| | 21 | 21,0 | 33,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 19,6 | 26,9 |
| ECART TYPE | | 1,26 | 3,69 |
| TEST DE STUDENT | | t = 4,56 | |

*Temps de Quick(tableau XIII)*
*—des rats témoins*
*—des rats traités*



| N° DE L'EXPERIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_{m'}$ |
| 6 | 24,0 | 2'45" | 0'45" | 3'30" | 70 mm | 5'30" | 2' | 7'30" | 40 mm |
| 12 | 23,2 | 2'45" | 0'30" | 3'15" | 60 mm | 4'15" | 4'30" | 8'45" | 29 mm |
| 13 | 25,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 74 mm | 4'30" | 3' | 7'30" | 30 mm |
| 14 | 29,2 | 3' | 0'45" | 3'45" | 68 mm | 5'30" | 5'15" | 10'45" | 26 mm |
| 18 | 27,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 72 mm | 4'15" | 3'30" | 7'45" | 30 mm |
| 21 | 33,0 | 2'45" | 0'30" | 3'15" | 75 mm | 4'30" | 7'30" | 12' | 25 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 2'40" | 0'35" | 3'15" | 69,8mm | 4'45" | 4'17" | 9'02" | 30 mm |

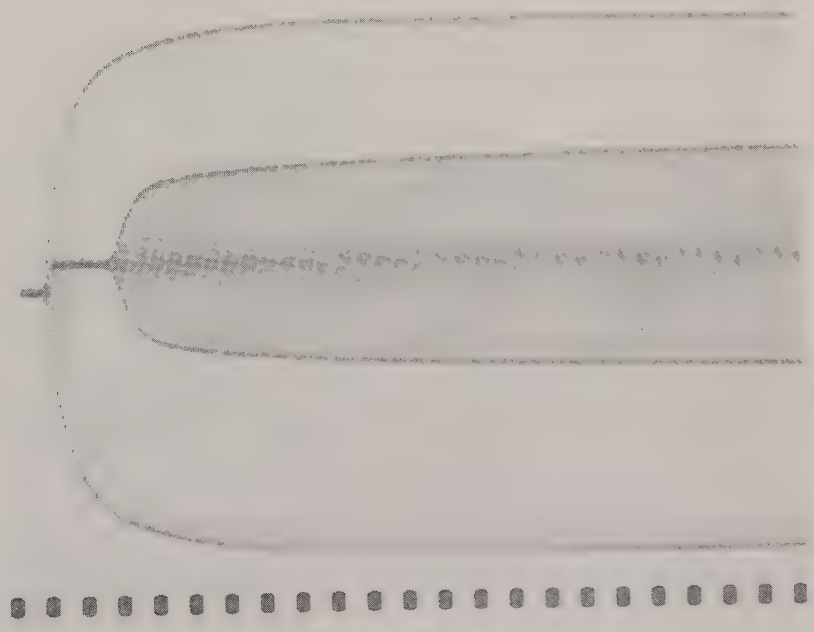
*Thromboélastogrammes des rats traités*
*—tracé type* 14
*—constantes (tableau XIV)*

METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

A LA DOSE
DE
400 MICROGRAMMES PAR KILOGRAMME

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 8 | 19,0 | 22,0 |
| | 12 | 18,0 | 18,0 |
| | 15 | 19,8 | 23,0 |
| RATS E.O.P.S. | 18 | 18,6 | 25,0 |
| | 19 | 19,0 | 29,0 |
| | 21 | 21,0 | 25,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 19,2 | 23,6 |
| ECART TYPE | | 1,03 | 3,67 |
| TEST DE STUDENT | | t = 2,89 | |

*Temps de Quick(tableau XV)*
*—des rats témoins*
*—des rats traités*



| N° DE L'EXPERIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_m$' |
| 8 | 22,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 65 mm | 4'30" | 5' | 9'30" | 28 mm |
| 12 | 18,0 | 2'15" | 0'20" | 2'35" | 68 mm | 3'45" | 2' | 5'45" | 35 mm |
| 15 | 23,0 | 3' | 1' | 4' | 63 mm | 4'30" | 5'30" | 10' | 25 mm |
| 18 | 25,0 | 2'20" | 0'30" | 2'50" | 71 mm | 4'30" | 2'45" | 7'15" | 29 mm |
| 19 | 29,0 | 2' | 0'30" | 2'30" | 73 mm | 6'45" | 3'45" | 10'30" | 29 mm |
| 21 | 25,0 | 2' | 0'30" | 2'30" | 80 mm | 5' | 2' | 7 | 46 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 2'20" | 0'33" | 2'53" | 70,5mm | 4'50" | 3'19" | 8'09" | 33,8 mm |

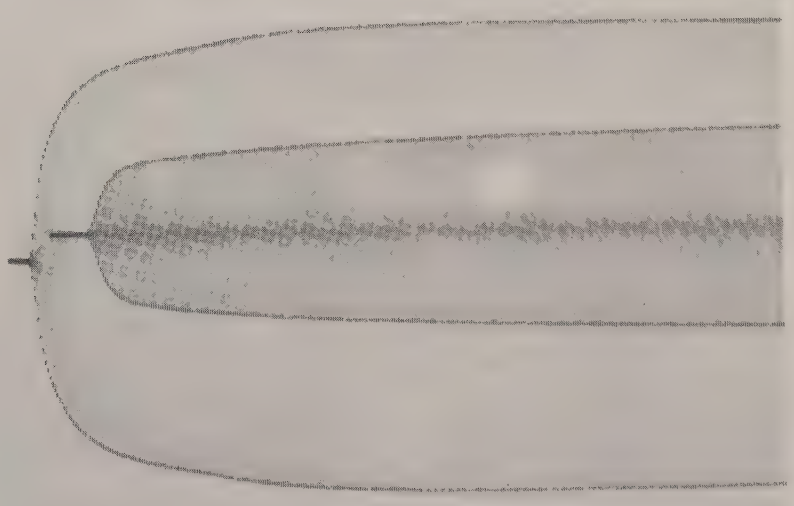
*Thromboélastogrammes des rats traités*
*-tracé type 18*
*-constantes(tableau XVI)*

METHYL-2 AMINO-3 NAPHTOQUINONE-1,4

A LA DOSE
DE
500 MICROGRAMMES PAR KILOGRAMME

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 6 | 21,0 | 21,4 |
| | 8 | 19,0 | 19,0 |
| | 10 | 19,2 | 21,0 |
| | 13 | 19,0 | 19,0 |
| RATS E.O.P.S. | 19 | 19,0 | 20,2 |
| | 21 | 21,0 | 22,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 19,7 | 20,4 |
| ECART TYPE | | 1 | 1,26 |
| TEST DE STUDENT | | t = 1,06 | |

Temps de Quick(tableau XVII)
—des rats témoins
—des rats traités



| N° DE L'EXPE-RIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_{m'}$ |
| 6 | 21,4 | 2'15" | 0'15" | 2'30" | 62 mm | 3'15" | 5' | 8'15" | 28 mm |
| 8 | 19,0 | 2' | 0'15" | 2'15" | 75 mm | 4' | 1'45" | 5'45" | 38 mm |
| 10 | 21,0 | 2'30" | 0'45" | 3'15" | 61,5mm | 5' | 6'15" | 11'15" | 26 mm |
| 13 | 19,0 | 2' | 0'45" | 2'45" | 64 mm | 5' | 3' | 8' | 28 mm |
| 19 | 20,2 | 2'15" | 0'15" | 2'30" | 78 mm | 3'45" | 1'45" | 5'30" | 40 mm |
| 21 | 22,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 70 mm | 4'15" | 2'45" | 7' | 30 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 2'12" | 0'27" | 2'40" | 68,4mm | 4'12" | 3'25" | 7'37" | 31,6 mm |

*Thromboélastogrammes des rats traités*
*—tracé type*
*—constantes (tableau XVIII)*

Commentaires

1° La méthyl-2,amino-3,naphtoquinone-1,4 est une vitamine K.

2° La dose nécessaire pour compenser l'avitaminose crée selon notre protocole se situe aux alentours de 500 microgrammes par kilogramme.

3° Les valeurs expérimentales de t décroissent quand la dose croît. Lorsque celle-ci atteint 500 µg/kg t = 1,06 donc la probabilité pour que la différence entre les moyennes des temps de QUICK de rats témoins et de ceux de rats traités ne soit pas significative est P = 0,70 ( ce qui est acceptable dans le cas d'une expérimentation biologique ).

4° Conformément à l'observation faite lors de la mise au point de notre méthode, les rats E.O.P.S. donnent des chiffres supérieurs à ceux fournis par les rats conventionnels. Afin de faire ressortir cette différence de sensibilité, nous avons représenté dans le tableau ci-dessous les moyennes des temps de QUICK obtenus en fonction du type de rats utilisés. Ces moyennes sont toujours comparées à celles des témoins de l'expérience correspondante. Les valeurs de s et t sont données.

| SUBSTANCE | METHYL-2, AMINO-3, NAPHTOQUINONE-1,4 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DOSE | 250 µg/kg | | | | 400 µg/kg | | | | 500 µg/kg | | | |
| TYPE DE RATS* UTILISES | (1) | | (2) | | (1) | | (2) | | (1) | | (2) | |
| TRAITEMENT ** | t | T | t | T | t | T | t | T | t | T | t | T |
| TEMPS DE QUICK (secondes) | 19,5 | 25,4 | 19,8 | 30,0 | 18,9 | 21,0 | 19,5 | 26,3 | 19,6 | 20,1 | 20,0 | 21,1 |
| ECART TYPE | 1,0 | 1,5 | 1,7 | 4,2 | 0,9 | 2,6 | 1,3 | 2,3 | 0,9 | 1,3 | 1,4 | 1,3 |
| TEST DE STUDENT | t = 6,5 | | t = 3,2 | | t = 1,3 | | t = 4,4 | | t = 0,6 | | t = 0,8 | |

* (1) rats conventionnels.(2) rats E.O.P.S.

** t= rats témoins. T= rats traités.

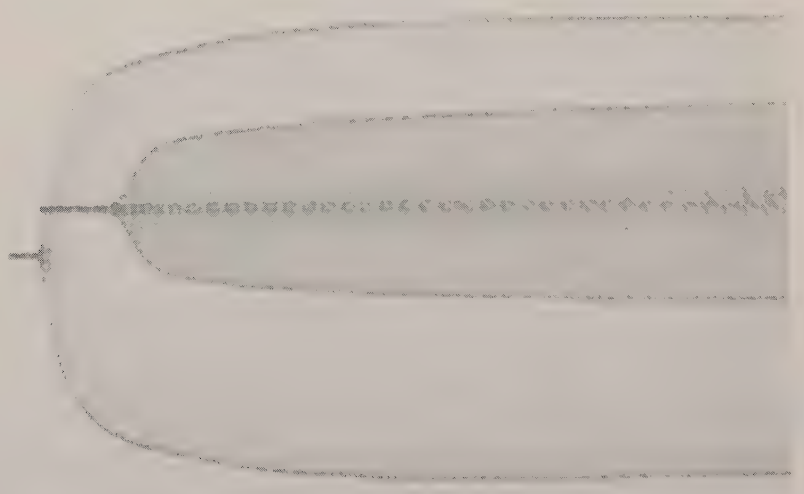
5° Nous avons déterminé les droites de régression représentant les temps de QUICK en fonction des doses de méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 et nous les avons comparées à celles concernant la méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 ( v.p. 126 ).

5-3-2-2 METHYL-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

A LA DOSE
DE
250 MICROGRAMMES PAR KILOGRAMME

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 3 | 19,0 | 24,0 |
| | 4 | 18,0 | 24,6 |
| | 10 | 19,2 | 22,0 |
| RATS E.O.P.S. | 17 | 19,0 | 30,0 |
| | 20 | 19,0 | 29,4 |
| | 22 | 18,4 | 35,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 18,7 | 27,5 |
| ECART TYPE | | 0,21 | 4,84 |
| TEST DE STUDENT | | t = 4,39 | |

Temps de Quick(tableau XIX)
—des rats témoins
—des rats traités



| N° DE L'EXPE-RIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_m$' |
| 3 | 24,0 | 2'30" | 0'40" | 3'10" | 70 mm | 5' | 3' | 8' | 30 mm |
| 4 | 24,6 | 2'30" | 0'30" | 3' | 71 mm | 4' | 1'30" | 5'30" | 32 mm |
| 10 | 22,0 | 1'45" | 0'30" | 2'15" | 70 mm | 2'45" | 5'15" | 8' | 29 mm |
| 17 | 30,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 69 mm | 3'30" | 5'30" | 9' | 29 mm |
| 20 | 29,4 | 2'30" | 0'45" | 3'15" | 62 mm | 5'15" | 6'30" | 11'45" | 26 mm |
| 22 | 35,0 | 2'45" | 0'30" | 3'15" | 75 mm | 7'15" | 5' | 12'15" | 33 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 2'25" | 0'34" | 2'59" | 69,5 mm | 4'37" | 4'27" | 9'05" | 29,8 mm |

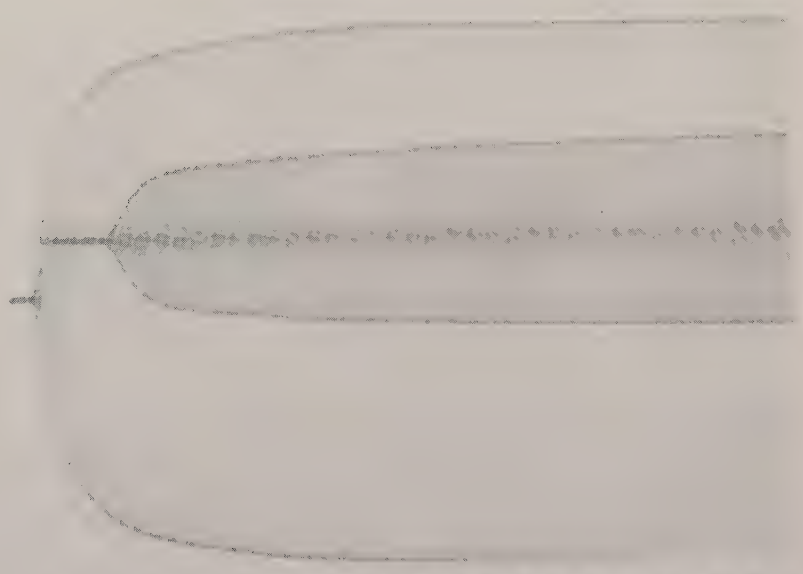
*Thromboélastogrammes des rats traités*
*-tracé type 20*
*-constantes (tableau XX)*

METHYL-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

*A LA DOSE*
*DE*
*400 MICROGRAMMES PAR KILOGRAMME*

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 7 | 20,0 | 20,8 |
| | 11 | 19,0 | 21,2 |
| | 11 | 19,0 | 19,2 |
| RATS E.O.P.S. | 17 | 19,0 | 24,0 |
| | 20 | 19,0 | 22,0 |
| | 22 | 18,4 | 29,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 19,0 | 22,7 |
| ECART TYPE | | 0,52 | 3,46 |
| TEST DE STUDENT | | t = 2,62 | |

*Temps de Quick(tableau XXI)*
*—des rats témoins*
*—des rats traités*



| N° DE L'EXPERIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_m$' |
| 7 | 20,8 | 2'15" | 0'15" | 2'30" | 71 mm | 5'30" | 4' | 9'30" | 27 mm |
| 11 | 21,2 | 2' | 0'15" | 2'15" | 79 mm | 3'15" | 1'30" | 4'45" | 38 mm |
| 11 | 19,2 | 2' | 0'30" | 2'30" | 72 mm | 5'15" | 4'45" | 10' | 25 mm |
| 17 | 24,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 63 mm | 4' | 2'45" | 6'45" | 30 mm |
| 20 | 22,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 71 mm | 4'30" | 2'30" | 7' | 35 mm |
| 22 | 29,0 | 2'30" | 0'45" | 3'15" | 69 mm | 5'15" | 2'30" | 7'45" | 32 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 2'15" | 0'27" | 2'43" | 70,8mm | 4'37" | 3' | 7'37" | 31,1 mm |

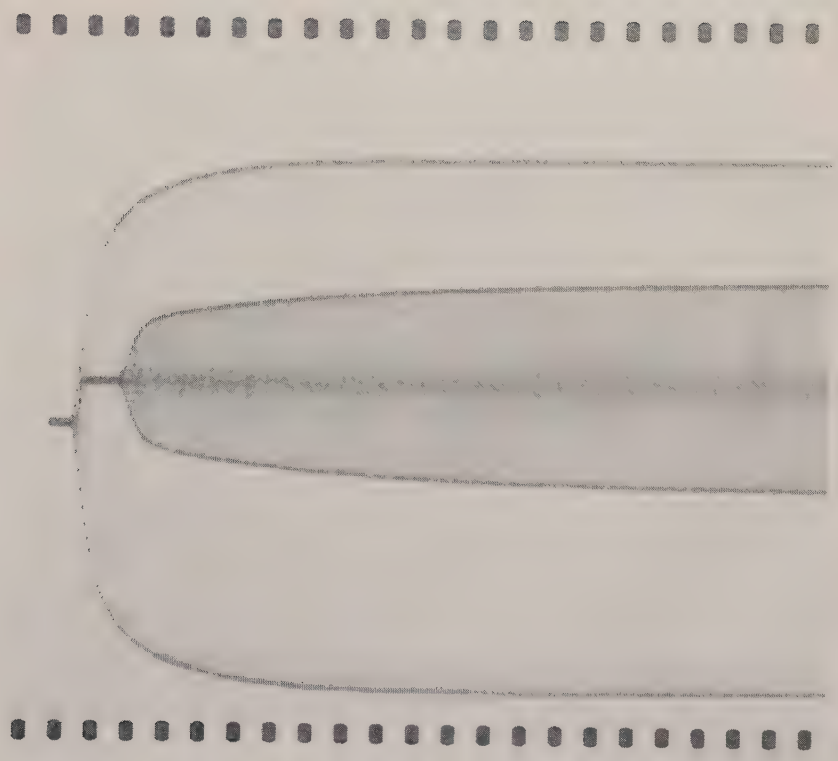
*Thromboélastogrammes des rats traités*
*—tracé type*
*—constantes(tableau XXII)*

METHYL-2 HYDROXY-3 NAPHTOQUINONE-1,4

A LA DOSE
DE
500 MICROGRAMMES PAR KILOGRAMME

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 7 | 20,0 | 20,0 |
| | 7 | 20,0 | 20,2 |
| | 11 | 19,0 | 20,8 |
| | 15 | 19,8 | 19,4 |
| RATS E.O.P.S. | 16 | 21,0 | 22,0 |
| | 20 | 19,0 | 21,0 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 19,8 | 20,5 |
| ECART TYPE | | 0,75 | 0,9 |
| TEST DE STUDENT | | t = 1,66 | |

Temps de Quick(tableau XXIII)
—des rats témoins
—des rats traités



| N° DE L'EXPERIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r'+ k' | $a_{m'}$ |
| 7 | 20,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 68 mm | 4'15" | 2'15" | 6'30" | 33 mm |
| 7 | 20,2 | 2'20" | 0'25" | 2'45" | 62 mm | 5' | 2'15" | 7'15" | 27 mm |
| 11 | 20,8 | 2'15" | 0'15" | 2'30" | 71 mm | 3'15" | 5' | 8'15" | 28 mm |
| 15 | 19,4 | 2'15" | 0'15" | 2'30" | 70 mm | 3'15" | 2'30" | 5'45" | 30 mm |
| 16 | 22,0 | 1'30" | 0'30" | 2' | 75 mm | 4'45" | 2'15" | 7' | 34 mm |
| 20 | 21,0 | 2'30" | 0'30" | 3' | 68 mm | 4'30" | 3'30" | 8' | 29 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 2'13" | 0'24" | 2'37" | 69 mm | 4'10" | 2'57" | 7'07" | 30,1 mm |

*Thromboélastogrammes des rats traités*
*—tracé type* 11
*—constantes (tableau XXIV)*

Commentaires

1° Comparée au dérivé hydroxylé correspondant, la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 possède une activité vitaminique K apparemment identique.

2° On retrouve aux erreurs d'expériences près les mêmes valeurs de t que pour la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4.

3° Les droites de régression * relatives aux temps de QUICK obtenus à partir de la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 et de la méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 , rendent compte de cette identité d'action. La dose théorique nécessaire pour subvenir aux besoins en vitamine K du rat carencé, correspond au point d'intersection des droites de régression avec une parallèle à l'axe des abscisses menée à partir du temps de QUICK moyen des rats témoins. Elle est de :

- 548 mg/kg pour la méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4
- 557 mg/kg pour la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4

4° Comme dans les expériences précédentes le tableau sui-

* v. p. 126

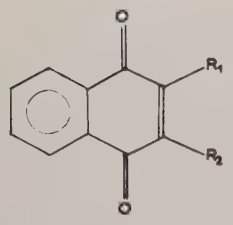
vant confirme les différences de sensibilité des rats conventionnels et E.O.P.S. ( voir également les droites de régressions ).

| SUBSTANCE | METHYL-2, HYDROXY-3, NAPHTOQUINONE-1,4 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DOSE | 250 µg/kg | | | | 400 µg/kg | | | | 500 µg/kg | | | |
| TYPE DE RATS * UTILISES | (1) | | (2) | | (1) | | (2) | | (1) | | (2) | |
| TRAITEMENT ** | t | T | t | T | t | T | t | T | t | T | t | T |
| TEMPS DE QUICK (secondes) | 19,0 | 23,5 | 18,8 | 31,4 | 19,3 | 20,4 | 18,8 | 25,0 | 19,7 | 20,1 | 20,0 | 21,5 |
| ECART TYPE | 0,7 | 1,4 | 0,3 | 3,1 | 0,6 | 1,0 | 0,3 | 3,6 | 0,5 | 0,6 | 1,4 | 0,7 |
| TEST DE STUDENT | t = 5,0 | | t = 7,0 | | t = 1,5 | | t = 2,9 | | t = 1,0 | | t = 1,3 | |

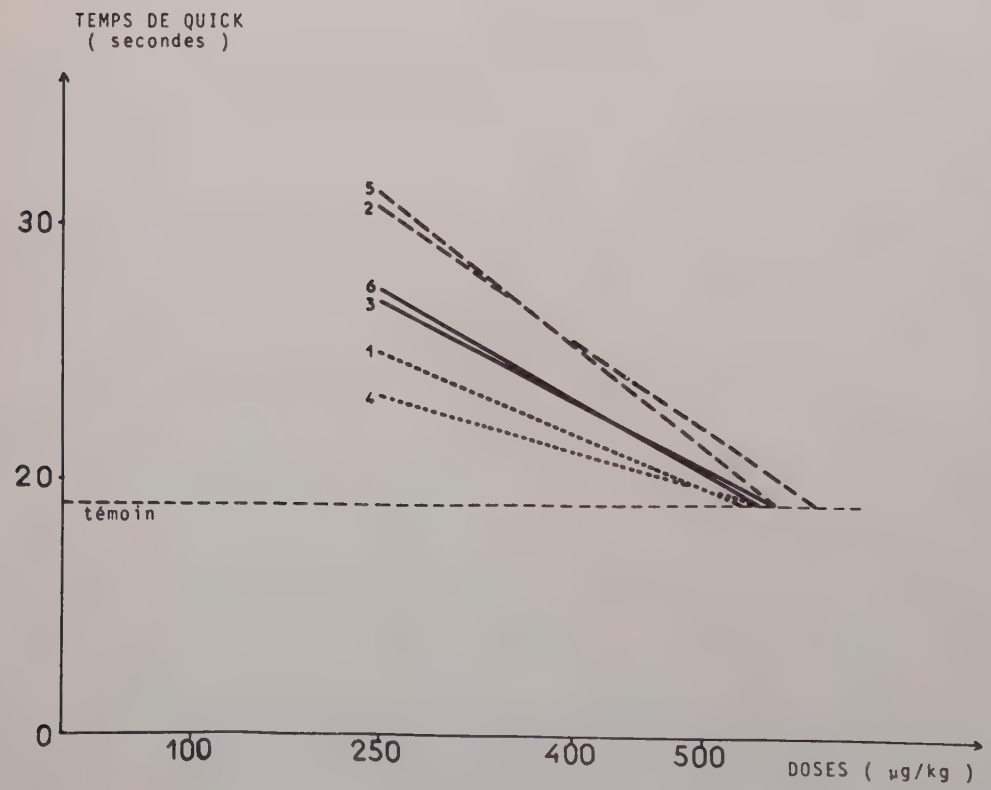
* (1) rats conventionnels. (2) rats E.O.P.S.

** t= rats témoins. T= rats traités.

# DROITES DE REGRESSION




| SUBSTANCE $R_1$ | SUBSTANCE $R_2$ | TYPE DE RATS UTILISES | N° | $\bar{X}$ | $\bar{Y}$ | a |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $CH_3$ | $NH_2$ | (1) | 1 | 381,8 | 22,2 | 0,021 |
| | | (2) | 2 | 385,7 | 25,9 | 0,034 |
| | | (1) +(2) | 3 | 383,3 | 23,7 | 0,026 |
| $CH_3$ | OH | (1) | 4 | 395,0 | 21,2 | 0,014 |
| | | (2) | 5 | 368,7 | 26,5 | 0,040 |
| | | (1)+(2) | 6 | 383,3 | 23,6 | 0,028 |



Remarque :

Les droites de régression (3) et (6) correspondent chacune à l'expérimentation sur 18 animaux ( rats conventionnels ou rats E.O.P.S. ), elles ont donc été obtenues à partir de 18 points.
Aux erreurs d'expériences près elles sont confondues.

En revanche les droites (1) et (4) correspondent chacune à l'expérimentation sur 9 rats conventionnels. Nous pensonsqu'elles se distinguent l'une de l'autre parce que le nombre d'expériences est trop petit et que les rats conventionnels donnent des réponses biologiques moins homogènes.

En effet les droites (2) et (5), plus voisines l'une de l'autre, correspondent au même nombre d'animaux mais il s'agit cette fois de rats E.O.P.S.

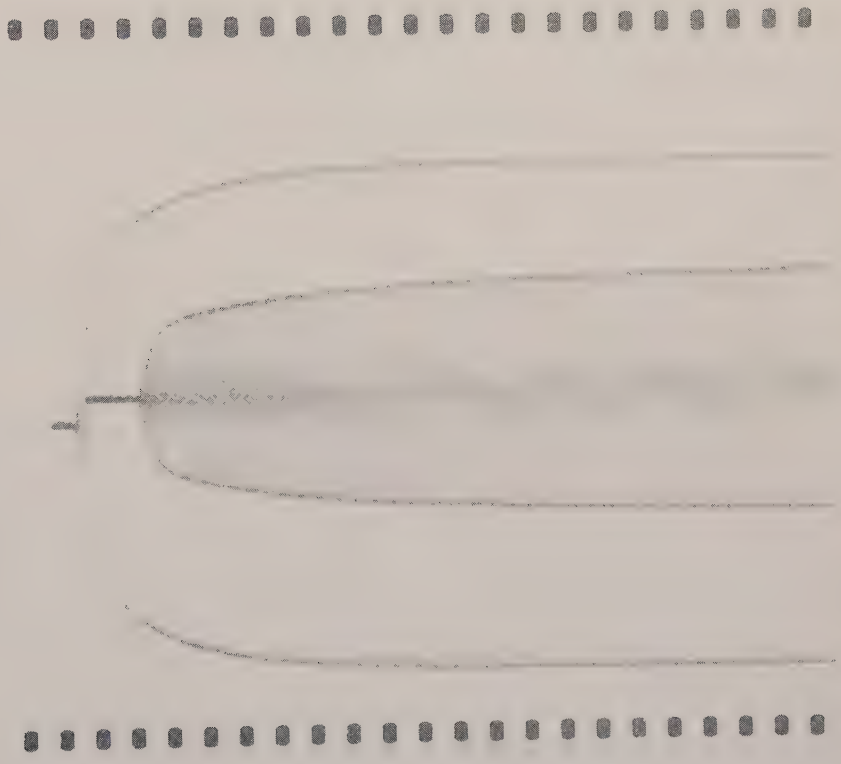
## 5-3-2-3 VITAMINE $K_1$

Afin de situer l'activité des dérivés naphtoquinoniques précédents, nous avons effectué une expérimentation selon un protocole identique en administrant à des rats de la vitamine $K_1$.

Nous avons établi après des essais préliminaires que l'apport exogène de cette vitamine, nécessaire pour suppléer à la carence des rats soumis à la vitaminothérapie A était de 30 µg/kg/jour.

| TYPE DE RATS UTILISES | N° DE L'EXPERIENCE | ANIMAUX TEMOINS | ANIMAUX TRAITES |
|---|---|---|---|
| RATS CONVENTIONNELS | 1 | 19,0 | 19,0 |
| | 1 | 19,0 | 19,0 |
| | 2 | 18,6 | 18,8 |
| | 5 | 18,0 | 18,8 |
| | 9 | 18,2 | 18,4 |
| | 9 | 18,2 | 19,6 |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 6 | 6 |
| MOYENNE | | 18,5 | 18,9 |
| ECART TYPE | | 0,43 | 0,4 |
| TEST DE STUDENT | | t = 1,66 | |

*Temps de Quick(tableau XXV)*
*—des rats témoins*
*—des rats traités*



| N° DE L'EXPE-RIENCE | TEMPS DE QUICK | PLASMAS NATIFS | | | | PLASMAS DEPLAQUETTES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | r | k | r + k | $a_m$ | r' | k' | r' + k' | $a_{m'}$ |
| 1 | 19,0 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 68 mm | 4'30" | 4'15" | 8'45" | 27 mm |
| 2 | 18,8 | 2' | 0'10" | 2'10" | 77 mm | 3'15" | 1'30" | 4'45" | 35 mm |
| 5 | 18,8 | 2'15" | 0'30" | 2'45" | 72 mm | 3'40" | 2'30" | 6'10" | 29 mm |
| 9 | 18,4 | 2'15" | 0'20" | 2'35" | 70 mm | 4'15" | 3' | 7'15" | 32 mm |
| 9 | 19,6 | 2'30" | 0'30" | 3' | 68 mm | 4'30" | 3'15" | 7'45" | 30 mm |
| NOMBRE D'EXPERIENCES | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| MOYENNE | | 2'15" | 0'24" | 2'39" | 71 mm | 4'02" | 2'54" | 6'56" | 30,6 mm |

*Thromboélastogrammes des rats traités*
*—tracé type*
*—constantes (tableau XXVI)*

Commentaire

Comparée à la vitamine $K_1$ l'activité de la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 comme celle du Phtiocol est 165 fois moins importante.

## *5-4 ETUDE BACTERIOLOGIQUE*

QUICK et STEFANINI (67 ) ont prouvé que la vitamine A n'influençait pas l'absorption ou l'utilisation des vitamines K.
Pour ces auteurs l'action de la vitamine A se situerait au niveau de la synthèse de la vitamine K par la flore intestinale.

Partant de ces travaux, on pouvait croire à une atteinte de cette flore. Nous avons donc fait une étude bactériologique ( frottis et ensemencements)du tractus intestinal des rats avitaminosés, comparée à celui des rats témoins. Nous n'avons constaté aucune modification quantitative de la flore bactérienne.
Il est permis dès lors de penser que le mécanisme d'action de la vitamine A sur la flore intestinale du rat est d'ordre métabolique et ne pourra être élucidé que par des études plus poussées " in vitro " .
Quoiqu'il en soit, il n'est pas surprenant que les meilleurs résultats aient été obtenus avec des animaux à flore réduite, ceux-ci étant plus sensibles,par cela même, à l'action de substances qui agissent sur la flore intestinale.
Nous pensons donc pouvoir recommander l'utilisation des rats E.O.P.S. afin d'obtenir les temps de QUICK les plus élevés.

# CHAPITRE VI

# DISCUSSION DES RESULTATS

Avant de présenter nos conclusions générales, il nous paraît utile d'examiner dans quelle mesure l'expérimentation biologique nous conduit à répondre positivement au problème essentiel qui nous était posé :

<< L'étude cristallographique permet-elle, dans le cas des dérivés α-naphtoquinoniques de mieux prévoir et d'expliquer leur action sur la coagulation ? >>

Cela nous amène à nous demander également si le simple raisonnement pouvait conduire aux mêmes résultats.

## *6-1 REMARQUES SUR LA " PREVISION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE"*

Il est très difficile de dire à priori quelle sera l'activité biologique d'une molécule. Lorsqu'une substance active a été découverte, les chimistes, rappelons-le, préparent quand cela est possible, un grand nombre de dérivés en apportant certaines modifications, par exemple : allongement ou ramification d'une chaine, déplacement ou remplacement d'un substituant, passage d'un cycle à un cycle potentiel, élimination d'une partie plus ou moins importante d'une molécule, etc...
D'une façon générale,on sait que les modifications qui n'entrainent pas la suppression ou la transformation de l'activité s'inscrivent dans des limites étroites, spécifiques

pour chaque série et que seule l'expérimentation pharmacodynamique permet de préciser. On pourrait multiplier les exemples.

Pour ces raisons, personne ne le conteste, la découverte de médicaments nouveaux de synthèse, nécessite presque toujours la préparation et l'étude pharmacodynamique d'un nombre considérable de molécules. Les essais infructueux sont beaucoup plus nombreux que les réussites. En règle générale les chimistes confient aux laboratoires de pharmacodynamie leurs produits en sachant que les " chances " de succès sont très faibles.
Lorsqu'un produit ( ou une série de produits) se révèle actif, il est le plus souvent difficile d'expliquer pourquoi parmi d'autres cette voie était meilleure.
Des études biochimiques ( mise en évidence de métabolisme ou de " récepteurs " etc... ) viennent parfois préciser un mode d'action : Cela éclaire le problème des relations entre l'activité et la structure moléculaire, mais cela ne le résoud pas complètement.

## *6-2 PREVISION DE L'ACTIVITE DANS LA SERIE DES DERIVES α-NAPHTOQUINONES*

Il semble que le domaine des dérivés α-naphtoquinoniques ( ou de leurs analogues ) soit l'un de ceux où les recherches ont échappé à l'empirisme et où les raisonnements théoriques ont apporté le plus de résultats significatifs.

Comme nous l'avons souligné grâce à une hypothèse féconde, MENTZER a pu découvrir des molécules antivitamines K très actives, mais d'autres auteurs choisissant des voies très voisines n'ont pas obtenu de résultats positifs. MENTZER rassemblant toutes les données expérimentales indique " les conditions de l'activité " des naphtoquinones et des dérivés voisins sur la coagulation sanguine .

GAULTIER et HAUW ont confirmé et complété par l'analyse des structures cristallines, les conceptions de MENTZER et à leur tour, à partir de données plus précises et notamment de la détermination des axes réactionnels, ils ont formulé une hypothèse sur l'action de moléculesdont on

ignorait les propriétés vis-à-vis de la coagulation.

Nous avons vérifié la complète exactitude de leurs prévisions : les quatre produits originaux expérimentés par nous sur l'animal ont agi de la manière prévue. Nous avons dépassé le stade qualitatif en montrant en particulier que des doses égales de méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 et de méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 ont quantitativement la même action biologique.

Comme nous l'avons déjà fait remarquer, c'est en rassemblant les résultats positifs de l'expérimentation que MENTZER tire des conclusions sur les caractéristiques chimiques des vitamines et anti-vitamines K. Au contraire, GAULTIER et HAUW ont prévu par une " sorte d'extrapolation " l'activité, avant tout essai biologique. La finesse des renseignements cristallographiques leur a permis d'affirmer nettement le sens de cette action.

A notre avis, il était difficile, par des considérations d'ordre uniquement chimique ou biochimique, de prévoir aussi catégoriquement un tel résultat.
Cela ne veut pas dire que l'idée de tester, à priori, avec quelques chances de succès l'action de la méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 sur la coagulation n'aurait pu être prise en considération avant l'étude de sa structure cristalline. Cependant, il faut le reconnaître, malgré leur nombre, les diverses équipes de chercheurs étudiant les modificateurs de la coagulation sanguine dans un but théorique ou pratique, ne se sont pas arrêtées sur les dérivés aminés en 3. Ceux-ci répondaient pourtant, semble-t-il, aux " conditions nécessaires " définies par MENTZER ( v.p. 17 ) tout comme les dérivés hydroxylés en 3 qui avaient donné des résultats intéressants.

Certaines naphtoquinones aminées en 3, notons-le, avaient été expérimentées pour rechercher leur activité tuberculostatique et fongicide ( 62 ) et non vitaminique K ou anti-vitaminique K.
On peut remarquer également que les vitamines $K_5$ et $K_6$ sont des amines. Ces molécules ont, semble-t-il, retenu l'attention, car les deux groupements $-NH_2$ ( ou $-NH_2$ et $-OH$ ), situés en 1,4 , permettent une oxydation aisée en une forme quinonique ( ou quinone-imine ) active.

Tout autre est le remplacement par $-NH_2$ de l'hydroxyle en 3. Les fonctions -OH ou $-NH_2$ sont alors certainement plus stables et elles confèrent à la molécule des propriétés chimiques très différentes et même opposées ( caractère acide dans un cas, basique dans l'autre ). Il était donc à notre avis difficile de prévoir l'action négligeable d'une telle modification sur l'activité vitaminique K.

Au contraire GAULTIER et HAUW ont été frappés en voyant les groupes -OH et $-NH_2$ jouer des rôles identiques dans les structures cristallines lorsqu'ils étaient placés en 3, l'un des atomes H du groupe $-NH_2$ ne donnant aucune liaison intermoléculaire, ce qui est surprenant.

Dans le domaine des dérivés halogénés antivitamines K un phénomène analogue se retrouve : la chloro-2 amino-3 naphtoquinone est même plus active que la chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone.

En revanche pour un chimiste ou un biochimiste il était beaucoup plus aisé, nous semble-t-il, de prévoir que l'activité des bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone et bromo-2 amino-3 naphtoquinone , serait analogue à celles des dérivés chlorés correspondants.

x x

x

L'ensemble de nos résultats montre la valeur des précisions apportées par les cristallographes aux biochimistes et aux pharmacologues.

L'examen des axes d'intéraction moléculaires ( v.p. 23 ) au sein du cristal ( stacking, liaisons hydrogène, liaisons par transfert de charge ) révèle des caractères communs que d'autres techniques physicochimiques ne mettent pas en évidence.

Par l'expérimentation sur l'animal, nous avons confirmé l'importance de ce type d'analogies, tout au moins

dans la série des dérivés α-naphtoquinoniques où les phénomènes d'empilements moléculaires ( staking ) permettent, sans doute,des associations avec les protéines par superpositions de noyaux polycycliques ( analogues à celles rencontrées dans les cristaux ).

Il serait également très intéressant de comparer les structures et les axes d'intéractions moléculaires du cholestérol et du sapogénol pour confirmer les conceptions de TAYEAU ( 78 ) selon lesquelles :

a) le cholestérol serait normalement " unis aux protéines du sérum par solvation de ses noyaux cycliques avec des formes semblables existant dans les protéines " .

b) le sapogénol, en raison de sa configuration similaire " prendrait la place du cholestérol pour l'expulser des cénapses cholestéroprotéidiques ".

En multipliant les confrontations d'études biologiques et d'études cristallographiques portant sur les mêmes substances on confirmera d'une façon encore plus nette, pensons-nous, les idées de Pierre ROMAIN qui sont à l'origine de ce travail.

# CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats que nous pouvons retenir se situent sur deux plans très différents :

- Les uns d'ordre quantitatif viennent directement de l'expérimentation biologique.

- Les autres d'ordre plus spéculatif, apportent une contribution aux recherches sur les relations entre la structure et l'activité des molécules.

A - Nous avons fait la synthèse de cinq dérivés α-naphtoquinoniques.
Après des déterminations toxicologiques nous avons entrepris des études pharmacodynamiques comportant l'essai de quatre produits et la comparaison avec quatre substances de référence .

1° La chloro-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 , la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 et la bromo-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 présentent une activité anti-vitaminique K.
La recherche de l'activité anti-vitaminique à été menée en comparant la moyenne des taux de prothrombine de lots de lapins témoins et de lots de lapins traités par des doses croissantes de produit.
Le plus actif, la bromo-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 , administré selon notre protocole opé-

ratoire à la dose de 140 mg/kg abaisse le taux de prothrombine à 50 pour cent. Cette activité est supérieure à celle de la chloro-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4 indiquée comme substance anti-vitaminique K dans la littérature.
Elle est cependant très inférieure à celle de la pindione utilisée couramment comme médica - ment.

2° La méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 est une vitamine K.
Nous avons mis cette activité en évidence par une méthode personnelle. En effectuant une détermination du temps de QUICK et une étude thromboélastographique nous avons constaté la carence en vitamine K de rats traités par la vitamine A, puis le rétablissement d'une coagulation normale par administration de doses croissantes de méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 à des lots de rats carencés de cette façon. Les résultats étaient toujours confrontés avec ceux fournis par des rats témoins.
La dose utile de méthyl-2 amino-3 naphtoquinone-1,4 est de 560 µg/kg; elle est sensiblement la même que celle du phtiocol ( 550 µg/kg ) qui est une vitamine K bien connue. Cette dose est cependant bien supérieure à celle de la vitamine $K_1$ ( 30 µg/kg ).

B - D'un point de vue plus général, nos travaux s'intègrent dans un ensemble de recherches dirigées par le Professeur GAY sur les corrélations entre la structure cristalline et l'activité biologique.
En effet nous avons effectué notre expérimentation pour vérifier l'hypothèse d'une équipe de son laboratoire . Celle-ci s'appuyant sur l'analyse cristallographique avait indiqué le sens de l'activité des produits que nous avons étudiés. Nous avons montré la justesse de ces prévisions. Ceci fait ressortir l'importance des renseignements cristallographiques qui ont permis, en série α-naphtoquinonique de prévoir, avec une exactitude inhabituelle en pharmacodynamie, des actions particulièrement nettes .

ooo

## BIBLIOGRAPHIE


1. ALMQUIST (H.J.) - Vitamin K Physiol.Rev., 1941, 21, 194.
2. ALMQUIST (H.J.), et KLOSE (A.A.), J.Amer.Chem.Soc.,1939,61,2557.
3. ANDERSON (G.F.) BARNHART (M.I.) - Prothrombin Synthesis in dog, Amer.J. Physiol. 1964, 206, 929-938.
4. ANDRUS (W.D.), LORD (J.W.), KAUER, Studies on the fate of plasma prothrombin, Science, 1940, 91, 48.
5. ANSBACHER (S.), Proc.Soc.Exptl. Biol.Med., 1940, 44, 248.
6. ANSBACHER (S.), J.Nutrition, 1941, 21, 1.
7. BINKLEY (S.B.), CHENEY (L.C.), HOLCOMB (W.F.),Mc KEE (R.W.),THAYER (S.A.), Mac CORQUODALE (D.W.) et DOISY (E.A.), J.Amer.Chem. Soc., 1939, 61, 2558.
8. BINKLEY (S.B.), Mac CORQUODALE (D.W.), THAYER (S.A.) et DOISY (E.A.), J.Biol. Chem., 1939, 130, 219.
9. BINKLEY (S.B.), Mc KEE (R.W.), THAYER (S.A.) et DOISY (E.A.), J.Biol. Chem., 1940, 133, 721.
10. BOREL (E.), DELTHIEL (R.), HURON (R.) - Probabilités, Erreurs, Armand Colin, 1954.
11. BRINKHOUS (C.M.) and HAWKINS (W.B.), Ibid. 1936, 63, 795.
12. BRÖMME (Ch.), Ber, 1888, 21, 386.
13. CAMPBELL (H.A.), LINK (K.P.) - Studies on the hemorrhagic sweet clover disease, the isolation and cristallisation of the hemorrhagic agent - J.Biol. Chem., 1941, 138, 21.
14. CANNAVA (A.), Boll.Soc.Ital.Biol., 1948, 24, 587.
15. CARRARA (G.) et BONNACI (G.), Grazz.Chim.Ital. 1943, 73, 276.
16. COLLETER (J.C.), Bull.Soc.Pharm.Bordeaux, 1960, 99, 161-187.
17. DAM (H.) - Nature, 1935, 135, 652.
18. DAM (H.) - Biochem. J., 1935, 29, 1273.
19. DAM (H.), Advances in enzymology, 1942, 2, 285-324.
20. DAM (H.) and GLAVIND (J.), J. Ibid., 1938, 32, 1018.
21. DANN (P.F.), Proc. Soc. Exptl.Biol. Med., 1939, 42, 663.

22. DESCHAMPS, Thèse Sciences Bordeaux, 1958.

23. DEVAUX (G.), Choix de Techniques de Biochimie Clinique, Gauthier-Villars éditeur, Paris, 1962.

24. DIEHL (Th.), MERZ (V.), Ber, 1878, 11, 1065.

25. FIESER (L.F.), J. Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 2559.

26. FIESER (L.F.), J. Biol. Chem., 1940, 133, 391.

27. FIESER (L.F.), TISHLER (M.) et SAMPSON (W.L.) - Vitamin K activity and structure - J. Biol. Chem., 1941, 137, 659-692.

28. FILDES (P.), Lancet 1940, 1, 955.

29. FRIES (K.) et OCHWATT (P.), Ber, 1923, 56, 1291.

30. GAULTIER (J.) - Thèse Sciences Bordeaux, 1966.

31. HARTERT(H.), Klin. Wochenschr., 1948, 26, 577-583.

32. HARTERT (H.), Zeitsch.f.d. Exper. Med., 1951, 117, 189-203.

33. HARTERT (H.), Deutsche Arch. Klin. Med., 1952, 199, 234.

34. HAUW (C.) - Thèse Sciences Bordeaux, 1966.

35. HAWKINS (W.B.) and WHIPPLE (C.H.), J.Exptl.Med., 1935, 62, 599.

36. HIRSCHMANN (R.) MILLER (R.) et WENDLER (N.L.), J. Amer., Chem. Soc., 1954, 76, 4592.

37. ISLER (O.) et DOEBEL (K.), Helv.Chim.Acta, 1954, 27, 225.

38. ISLER (O.), RÜEGG (R.), CHOPARD-DIT-JEAN L.H., WINTERSTEIN (A.) et WISS (O.), Helv. Chim. Acta, 1958, 41, 786.

39. JANSEN (K.F.) et JENSEN (K.A.), Z.Physiol. Chem., 1942, 277, 660.

40. KARRER (P.), GEIGGER (A.), LEGLER (R.), RÜEGGER (A.), et SALOMON (H.), Helv. Chim. Acta, 1939, 22, 1464.

41. KAULLA (N.V.), Klin.Wschr., 1943, 22, 205-208.

42. KOMEI, MIYAKI et NISABURO IKEDA, J.Pharm. Soc.Japan,1953,73,961-964

43. LEE (J.), SOLMSSEN (U.V.), Proc.Soc.Exptl.Biol.Med, 1940, 45, 407

44. LEHMANN (J.), Laucet 1943, 1, 458.

45. LIEBERMANN - SCHLOSSBERG, Ber, 1899, 32, 2095

46. LIGHT (R.F.), ALSCHER (R.P.) and FREY (C.N.), Science,1944, 100, 225-226.

47. LINK (K.P.), Fed. Proc., 1945, 4, 176.

48. Mac CORQUODALE (D.W.), CHENEY (L.C.), BINKLEY (J.B.), HOLCOMB (W.F.), Mc KEE (R.W.), THAYER (S.A.), et DOISY (E.A.), J.Biol. Chem., 1939, 131, 357.

49. Mac ELVAIN et ENGEHLARD, J.Am. Chem. Soc., 1944, 66, 1077.

50. MACHEBOEUF, Exp.Ann.Bioch.Med., 1945, V°série, 72-104.

51. Mc KEE (R.W.), BINKLEY (S.B.), Mac CORQUODALE (D.W.), THAYER (S.A.) et DOISY (E.A.), J. Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 1295.

52. Mc KEE (R.W.), BINKLEY (S.B.), THAYER (S.A.), Mac CORQUODALE (D.W.) et DOISY (E.A.), J.Biol.Chem., 1939, 131, 327.

53. MARTIUS (C.), Proceed.Third Internat.Congr.Biochemistry, Bruxelles 1955 (C.Liébecq éditeur), Acad.Press.New-York, 1956.

54. MENTZER (C.), les antivitamines, C.N.R.S. Paris, 1949,152-163.

55. MENTZER (C.), MEUNIER (P.), LECOQ (J.) et BILLET (Mlle D.), Bull. Soc. Chim., 1945, (5), 12, 430-437.

56. MEUNIER (P.), les antivitamines C.N.R.S. Paris, 1949, 164-171.

57. MEUNIER (P.) et MENTZER (C.), C.R. Ac.Sc., 1942,213, 259-261.

58. Meunier (P.), MENTZER (C.) et BUU HOI (N.G.), Bull. Soc.Chem. Biol., 1945, 27, 191-194.

59. MIGNON (P.H.), Bull.Soc.Pharm.Bordeaux, 1967, 106, 158-162.

60. MOORE (T.) and WANG (Y.L.), Biochem.J., 1945, 39, 222-228.

61. MORTON (R.A.), Biochemistry of Quinones, Académic Press, Edit., London and New York, 1965.

62. OREIU (I.), Bull.Soc.Chem.Biol., 1961, 1, 44.

63. OVERMAN (R.S.) et coll., J.Biol.Chem., 1944, 153, 5-24.

64. PRATT (R.) et coll., J.Amer.Pharm.Ass., 1950, 39, 127.

65. QUICK (A.J.), J.Biol.Chem., 1940, 133, LXXVIII.

66. QUICK (A.J.), COLLENTINE (G.) - Rôle of vitamin K in the synthesis of prothrombin, Am.Journ. Physiol., 1951, 164, 716-721.

67. QUICK (A.J.) and STEFANINI (M.), J.Biol.Chem.1948, 175, 945-952.

68. RABY (C.), Hémostase et coagulation, S.P.E.I., Paris, 1959.

69. RABY (C.) - Biologie des hémorragies et des thromboses - Masson 1966.

70. RABY (C.), Ann.Biol.Clin., 1959, 5-6, 357-368.

71. ROMAIN (P.), Bull.Féd.Fr.Am.Pharm.Rés., 1960, 54,221-240.

72. SAH (P.P.T.), Z.f.Vit.Horm.Ferm.Forsch 1950, 3, 324.

73. SAH (P.P.T.), SUBBARAJU (G.) et DANIELS (T.C.), Z.f.Vit.Horm. Ferm.Forsch., 1949, 3, 87.

74. SCHEUERBRANDT (G.), Chimie et biochimie des vitamines K, Produits Pharmaceutiques, Vol. 13, n°12, 1958.

75. SCHOENHEYDER (F.), Biochem. J., 1936, 30, 890.

76. SOULIER (J.P.), Thèse Médecine, Paris, 1944.

77. TAINTER (M.L.) et MILLER (L.C.) Proc.Soc.Exp.Biol. and Med., 1944, 57, 261.

78. TAYEAU (F.), Thèse Doct.Méd., Bordeaux 1944.

79. THAYER (S.A.), Mac CORQUODALE (D.W.), Mc KEE (R.W.) and DOISY, J.Biol. Chem., 1938, 123, CXX.

80. THAYER (S.A.), Mac CORQUODALE (D.W.), Mc KEE (R.W.) and DOISY, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1939, 40, 478.

81. TREVAN (J.W.), Proc. Royal. Soc.Biol., 1927, 101, 483.

82. VALETTE (G.), Précis de Pharmacodynamie, 2ème édition, Masson éditeur, 1944.

83. WOODS (D.D.), Brit J. Exp.Path., 1940, 21, 38-63 et 74-89.

84. YATES (F.) et FISHER (R.A.), Statistical tables for agricultural, biological and medical research, Oliver and Boyd Ed. Edimbourg, 1953.

85. ZINCKE (Th.), SCHMIDT (M.), Ber 1894, 27, 2753 - 2762.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

MODE D'ACTION DES SUBSTANCES

ANTI-CANCEREUSES

Vu,
Le Doyen :
F. TAYEAU

Bon à imprimer
Le Président de Thèse :
F. TAYEAU

Vu et permis d'imprimer
Bordeaux Mars 1968
Le Recteur de l'Université :
J. BABIN